



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

---

## **MÉTODOS QUÍMICOS PARA PROMOVER ESTERILIZAÇÃO DE CÃES E GATOS MACHOS**

Victor Augusto de Paula Pinto

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carolina Madeira Lucci

Brasília, DF

Dezembro, 2018



**VICTOR AUGUSTO DE PAULA PINTO**

---

**MÉTODOS QUÍMICOS PARA PROMOVER ESTERILIZAÇÃO DE  
CÃES E GATOS MACHOS**

Trabalho de conclusão de curso de  
graduação em Medicina veterinária,  
apresentado junto à Faculdade de  
Agronomia e Medicina Veterinária da  
Universidade de Brasília

**Orientadora:** Profa. Dra. Carolina Madeira Lucci

Brasília, DF

Dezembro, 2018

P659m      Pinto, Victor Augusto de Paula  
             Métodos químicos para promover esterilização de cães e  
             gatos machos / Victor Augusto de Paula Pinto; orientador  
             Carolina Madeira Lucci. -- Brasília, 2018.  
             65 p.

             Monografia (Graduação - Medicina Veterinária) --  
             Universidade de Brasília, 2018.

             1. Castração. 2. Controle Populacional. 3. Castração  
             Química. I. Lucci, Carolina Madeira, orient. II. Título.

## Cessão de Direitos

Nome do Autor: Victor Augusto de Paula Pinto

Título do Trabalho de Conclusão de Curso: Métodos químicos para promover esterilização de cães e gatos machos

Ano: 2018

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta monografia e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta monografia pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

---

Victor Augusto de Paula Pinto

## Sumário

PARTE I – Métodos químicos para promover esterilização de cães e gatos machos	
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. ANATOMOFISIOLOGIA REPRODUTIVA.....	3
2.1 ESPERMATOGÊNESE.....	3
2.2 EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-GONADAL.....	4
2.3 TESTÍCULOS.....	5
2.4 EPIDÍDIMO.....	9
2.5 O PAPEL DO ZINCO NA REPRODUÇÃO DE MACHOS.....	11
3. MÉTODOS NÃO CIRÚRGICOS DE ESTERILIZAÇÃO.....	12
3.1 CASTRAÇÃO HORMONAL.....	13
3.1.1 PROGESTÁGENOS.....	13
3.1.2 ANDRÓGENOS.....	13
3.1.3 ANÁLOGOS DE GNRH.....	14
3.2 IMUNOCONTRACEPÇÃO.....	16
3.2.1 IMUNIZAÇÃO CONTRA O GNRH.....	16
3.2.2 IMUNIZAÇÃO CONTRA O LH.....	17
3.2.3 IMUNIZAÇÃO CONTRA ANTÍGENOS ESPERMÁTICOS.....	17
3.3 CASTRAÇÃO QUÍMICA.....	19
3.3.1 CLORETO DE CÁDMIO ( $\text{CdCl}_2$ ).....	20
3.3.2 ZINCO.....	25
3.3.3 CLORETO DE CÁLCIO ( $\text{CaCl}_2$ ).....	36
3.3.4 DISCUSSÃO CASTRAÇÃO QUÍMICA.....	48
4. CONCLUSÃO.....	50
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
PARTE II – RELATÓRIO DE ESTÁGIO FINAL	
1. INTRODUÇÃO.....	63
2. ESTRUTURA FÍSICA.....	63
3. ATIVIDADES REALIZADAS.....	64
4. CONCLUSÃO.....	68

## RESUMO

O controle populacional de cães e gatos errantes é uma preocupação mundial, pois esses animais são portadores de zoonoses, predam a fauna nativa e atacam animais domésticos. A adoção de todos esses animais é impossível, devido à sua grande capacidade reprodutiva, portanto, a esterilização é a alternativa mais viável. Apesar das fêmeas conceberem diversos filhotes em uma única gestação, um único macho é capaz de emprenhar muitas fêmeas em um curto período de tempo, sendo sua esterilização mais eficiente no controle populacional. Animais submetidos a métodos cirúrgicos necessitam de tratamento especial pré e pós-cirurgia, sendo necessárias despesas com fármacos e equipamentos cirúrgicos. Fora isso, as complicações pós-cirurgia podem ser extensas, tornando esses métodos pouco viáveis para uso em larga escala. Os métodos não cirúrgicos são mais baratos, não requerem o emprego de um cirurgião e têm período de recuperação substancialmente inferior. Os métodos não cirúrgicos se dividem em três grupos: Terapia Hormonal, Imunocontracepção e Castração Química. A terapia hormonal e a imunocontracepção não são métodos confiáveis para o controle populacional devido a seu período limitado de efetividade, enquanto a castração química alcança resultados permanentes, sendo uma alternativa mais viável. Porém, para que a castração química seja efetiva, ela deve danificar todo o tecido envolvido, sob risco de haver regeneração de células de Leydig e até de túbulos seminíferos. Diversos métodos promissores de castração química já foram descritos, mas ainda são necessários muitos estudos sobre a amplitude de seus efeitos a longo prazo e substância ideal para cada espécie.

**Palavras-chave:** controle populacional; castração química; zinco

## ABSTRACT

Population control in stray cats and dogs is a worldwide concern, as these animals carry zoonotic diseases, prey on the native wildlife and attack domestic animals. The adoption of all of these animals is impossible, due to their great reproductive capacity, thus, sterilization is the most viable option. Despite females being able to conceive several puppies in a single gestation, a single male is able to impregnate many females in a short period of time, making its sterilization the efficient choice in population control. Animals submitted to surgical methods require special pre and post-surgery treatment, resulting in the necessity of expenses with drugs and surgical equipment. Also, post-surgery complications can be significant, rendering these methods infeasible for use in large scale. Non surgical methods are cheaper, don't require the presence of a surgeon and have a much shorter recuperation period. Non surgical methods can be divided into three groups: Hormone therapy, Immunocontraception and chemical castration. Hormone therapy and immunocontraception aren't reliable for population control by reason of the short duration of their effects, while chemical castration can achieve permanent results, being a better alternative. Although, for chemical castration to be effective, it must damage all the involved tissue, lest there'll be regeneration of Leydig cells and seminiferous tubules. Many promising methods of chemical castration have been described, but several studies about the amplitude of their long-term effects and ideal compound for each species are still required.

**Keywords:** population control; chemical castration; zinc

## 1. Introdução

A castração em machos já é reconhecida a milhares de anos. Era utilizada nos animais para domesticar mais facilmente um rebanho e evitar comportamentos indesejados. (Taylor, 2002)

Por volta de 6.200 A.C, as sociedades que viviam da plantação de grãos viram nos bovinos uma oportunidade para aumentar sua produção, fundindo a agricultura e o pastoreio. Diferente de carneiros e bodes, os touros eram fortes o suficiente para tração, sendo utilizados para arar a terra, para transporte e outras tarefas criadas pelas sociedades humanas cada vez maiores. Para que os touros realizassem essas tarefas, era necessário desenvolver algum método que os tornasse dóceis. Também era impossível manter um grande número de touros confinados juntos ou na companhia de vacas, a menos que fossem castrados. Antes disso, os machos eram criados apenas pela sua carne, sendo poucos machos mantidos vivos, apenas com o propósito de manter as fêmeas lactantes. Agora, as sociedades agricultoras haviam encontrado uma espécie animal cujo uso seria mais lucrativo se muitos adultos machos fossem mantidos vivos (Taylor, 2002). Do séc. XV ao séc. XIX a técnica começou a adquirir caráter profissional e foi se aprimorando. Esses profissionais tinham uma licença especial para castrar animais de fazenda. A medicina veterinária moderna no final do séc. XVIII lentamente tomou conta do processo de castração, trazendo certo nível de humanidade ao processo. Em 1975, uma publicação da British Small Animal Veterinary Society declarou que qualquer um com idade superior a 18 anos estava legalmente autorizado a realizar castração de um cão ou um gato até que esse tivesse seis meses de idade, desde que o procedimento anestésico adequado fosse utilizado. Em 2007, a lei havia mudado e somente médicos veterinários licenciados poderiam realizar a castração de cães ou gatos. (Purswell & Jöchle, 2010).

Hoje, sabemos que a esterilização tem grande importância na medicina veterinária. Neoplasias testiculares são as neoplasias mais comuns em cães machos, estando o tumor de células de Sertoli e tumor intersticial entre os principais (Johnston, 2001). Esses tumores secretam suas secreções descontroladamente, desregulando o equilíbrio hormonal do corpo e levando a diversas síndromes

paraneoplásicas. Outra doença importante é a hiperplasia benigna da próstata, sendo dependente de concentrações aumentadas de Di-Hidrotestosterona (DHT). A castração pode evitar todas essas patologias (Johnston, 2001). Além disso, a castração evita comportamentos e cruzamentos indesejáveis e auxilia no controle populacional (Cavaliere, 2017). Outra possibilidade é seu uso para promover maior ganho de peso nos rebanhos (Da Costa, 2002).

Quando se trata de controle populacional, diversos estudos e modelos matemáticos feitos com insetos propuseram que a esterilização exclusiva de machos e seu retorno a uma determinada população, seriam suficientes para, em um pequeno número de gerações, levarem aquela população à extinção (Knipling, 1959; Berryman, 1967). Apesar de realizado com insetos, Knipling (1959) propôs que esse modelo poderia ser usado com qualquer animal. A esterilização de cães e gatos de rua machos é mais eficiente para o controle populacional devido ao grande potencial reprodutivo de um único macho, que pode dar origem a muito mais filhotes do que uma única fêmea poderia (Johnston, 2001). O controle populacional é de importância internacional, podendo auxiliar na diminuição do número de animais de rua, assim como reduzir drasticamente a prevalência de doenças que ponham em risco a saúde pública (Jana & Samanta, 2007) e corrigir o desequilíbrio no ecossistema pela caça excessiva da fauna nativa por parte dos gatos de rua (Paranzini et al., 2018). A castração cirúrgica é eficiente, mas pode ocorrer sangramento e infecção, além de ser cara, requerer a presença de cirurgiões e ter um período de recuperação lento, sendo necessário o uso de medicamentos para controlar a dor. Isso torna o método cirúrgico um candidato pouco eficiente para o controle populacional (Jana & Samanta, 2007). Comparado a métodos cirúrgicos, os métodos não cirúrgicos causam menos dor e estresse para os animais, além de eliminar fatores como miíase e sangramento (Cohen et al., 1990). Além disso, um estudo realizado em São Paulo demonstrou que 56,5% dos proprietários de cães adotados em abrigos é contra a castração cirúrgica, citando compaixão, falta de necessidade, custo e mudança de comportamento como principais justificativas (Soto et al., 2005).



## 2. Anatomofisiologia Reprodutiva

O sistema reprodutor masculino tem atividade gametogênica a partir da puberdade e por toda a vida do indivíduo, produzindo e liberando grande quantidade de espermatozoides (Berne & Levy, 2009). Em cães, o volume ejaculado pode variar entre 2,5 a 80 mL e a concentração de espermatozoides varia de 4 a  $400 \times 10^6/\text{mL}$  (Johnston, 2001). Já nos gatos, o volume varia de 0,02 a 0,12mL. Um volume bem menor que o do cão, mas com a compensação de uma concentração espermática com variação entre 100 a  $2600 \times 10^6$  espermatozoides por mL (Dukes, 2006). Os órgãos genitais estão envolvidos no amadurecimento, transporte e armazenamento dos espermatozoides. Compreendem um par de testículos, epidídimo, ducto deferente, uretra e glândulas genitais acessórias. Os testículos estão envolvidos na produção de esperma e hormônios, enquanto o epidídimo armazena espermatozoides durante seu amadurecimento antes de saírem pelo ducto deferente e pela uretra. As glândulas acessórias também escoam conteúdo para a uretra, contribuindo para o volume seminal. A porção distal da uretra une os caminhos para a passagem da urina e do sêmen. O pênis é o órgão copulador, que se introduz na vagina da fêmea e deposita o sêmen no trato reprodutor feminino (König, 2011).

### 2.1 Espermatogênese

A espermatogênese consiste na espermatocitogênese (formação de espermátides a partir de espermatogônias) e espermiogênese (diferenciação das espermátides em espermatozoides), ocorrendo no epitélio germinativo de túbulos seminíferos.

As células menos diferenciadas são denominadas espermatogônias. Duas populações de espermatogônias existem: uma população reserva resistente a radiação e injúrias tóxicas residindo firmemente aderidas à lâmina basal, e a população proliferativa. As espermatogônias proliferativas se dividem por mitose, mudando de espermatogônia tipo A para espermatogônia tipo B ou espermatogônias filhas (Berne & Levy, 2009). A citocinese entre as células filhas é incompleta, permitindo que as células se comuniquem entre elas, tendo sua manutenção através

de pontes celulares. A espermatogônia filha inicia um processo de meiose e, durante a fase de prófase, é denominada espermatócito primário (Seeley et al., 2011). Em sua primeira divisão, se divide em espermatócitos secundários, que se dividem em espermatídes haplóides. As espermatídes são pequenas e arredondadas, eventualmente sofrendo a metamorfose denominada espermiogênese. Elas se viram para a membrana basal e completam o desenvolvimento. Ocorre alongamento do núcleo, formação do acrossomo, uma pequena estrutura sobrepondo a cabeça, desenvolvimento do flagelo com a mitocôndria formando a peça intermediária e expulsão do citoplasma remanescente para o lúmen do túbulo seminífero. Os espermatozoides imaturos são soltos no lúmen tubular pelas células de Sertoli. Esse processo é denominado espermição (Berne & Levy, 2009). Eles então são mandados até a rede testicular e, em seguida, até a cabeça do epidídimo. No epidídimo, espermatozoides ganham motilidade e habilidade de fertilizar, sendo armazenados por fim, na cauda do epidídimo (Johnston, 2001)

## **2.2 Eixo hipotálamo-hipófise-gonadal**

Os mecanismos hormonais envolvendo o sistema reprodutivo do macho envolvem o hipotálamo, a hipófise e os testículos (Figura 1). Um hormônio denominado Hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) é secretado pelo hipotálamo, que passa pelo sistema porta-hipofisário, alcançando a porção anterior da hipófise. As células, em resposta à presença do GnRH, secretam dois hormônios, chamados de gonadotrofinas, pois influenciam a função das gônadas.

As duas gonadotropinas são o hormônio Luteinizante (LH) e o Hormônio Folículo-estimulante (FSH). Seus nomes vêm de suas funções em fêmeas, mas eles têm função importante em machos.

A testosterona é o principal hormônio masculino. Ela é classificada como um andrógeno, pois estimula o desenvolvimento das estruturas reprodutivas masculinas e características sexuais secundárias (Seeley, 2011).

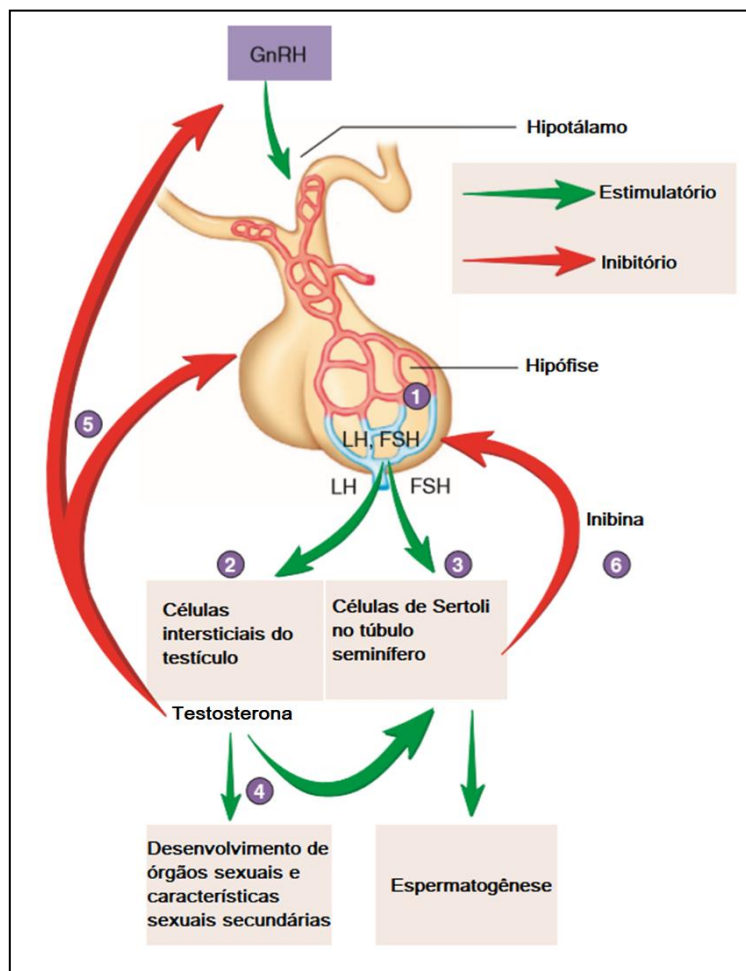


Figura 1 - Regulação de hormônios da reprodução no macho (Adaptado de Seeley, 2011)

A testosterona também retroalimenta negativamente a produção de LH, seja na forma de testosterona seja na forma de seus metabólitos, Di-hidroxitestosterona (DHT) e 17 $\beta$ -estradiol. Esses três hormônios, além de inibir a expressão do receptor de LH nas células de Leydig, também suprimem a expressão da produção de GnRH no hipotálamo e do receptor de GnRH na hipófise (Berne & Levy, 2009).

O FSH se liga às células de sustentação dos túbulos seminíferos (Células de Sertoli), promovendo o desenvolvimento dos espermatozoides (Seeley, 2011) ao auxiliar a conversão de testosterona em estrogênio (Dukes, 2006). Além disso, ao se ligar na célula de Sertoli, estimula a síntese da proteína Inibina, que retroalimenta negativamente a produção seletiva de FSH (Berne & Levy, 2009) e converte a testosterona em DHT, um andrógeno mais potente que a testosterona (Dukes, 2006).

## 2.3 Testículos

O testículo é revestido por uma cápsula fibrosa denominada túnica albugínea, composta por fibras colágenas, apresentando irrigação visível em um padrão característico para cada espécie (König, 2011). Histologicamente, a túnica albugínea apresenta um espessamento denominado mediastino testicular de onde saem septos fibrosos que atingem a túnica albugínea do outro lado, dividindo cada testículo em aproximadamente 250 compartimentos piramidais, denominados lóbulos testiculares. Como os septos são incompletos, os lóbulos se comunicam entre si. Cada lóbulo contém um a quatro túbulos seminíferos, envoltos por tecido conjuntivo frouxo, que contem vasos sanguíneos, linfáticos, nervos e células de Leydig, formando o compartimento peritubular (Junqueira & Carneiro, 1999; Berne & Levy, 2009).

Além do compartimento peritubular, os túbulos seminíferos criam um compartimento intratubular, composto pelo epitélio seminífero (Berne & Levy, 2009). A parede de cada túbulo seminífero é composta por células de sustentação, denominadas células de Sertoli, se estendendo da lâmina basal até o lúmen (Figura 2) (König, 2011). As células de Sertoli formam junções aderentes, comunicando-se com células da linhagem germinativa em todos os seus estágios. Ao formar e desfazer essas junções, elas guiam as células espermáticas em direção ao lúmen conforme essas passam para os estágios tardios da espermatogênese. Outra característica das células de Sertoli é a capacidade de formar junções compactas entre elas, dividindo o epitélio seminífero em um compartimento basal, contendo espermatogônias e espermatócitos primários no estágio inicial, e um compartimento adluminal contendo espermatócitos primários em estágio avançado e todos os estágios seguintes de células espermáticas. Conforme, as células germinativas evoluem, as junções entre as células de Sertoli se desagregam e se agregam. Essa junção compacta entre elas forma a base física para a barreira hematotesticular, criando um ambiente imunologicamente seguro para o desenvolvimento do espermatozoide. As junções compactas restringem o movimento de substâncias entre o sangue e as células germinativas, permitindo às células de Sertoli total controle sobre a disponibilidade de nutrientes para as células da linhagem germinativa (Figura 3) (Berne & Levy, 2009).

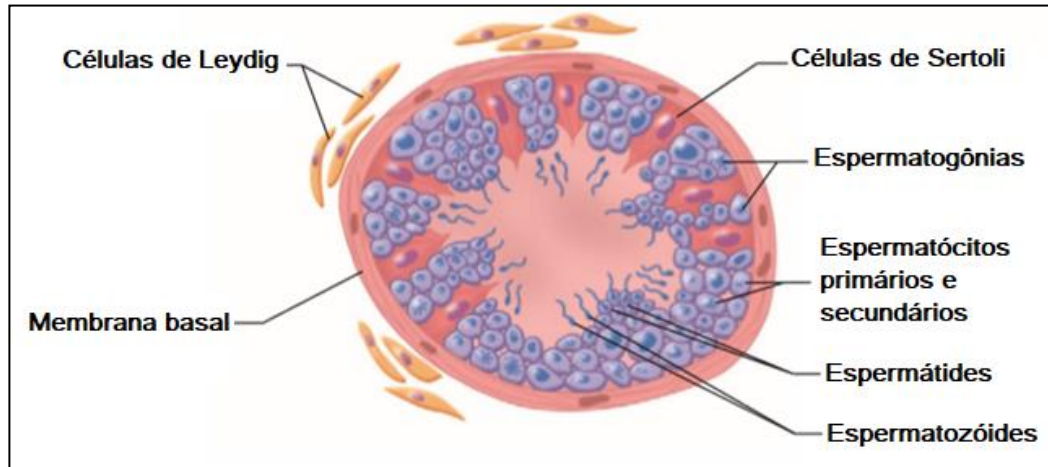


Figura 2 - Esquema de um corte transversal de um túbulo seminífero. (Adaptado de Seeley, 2011)

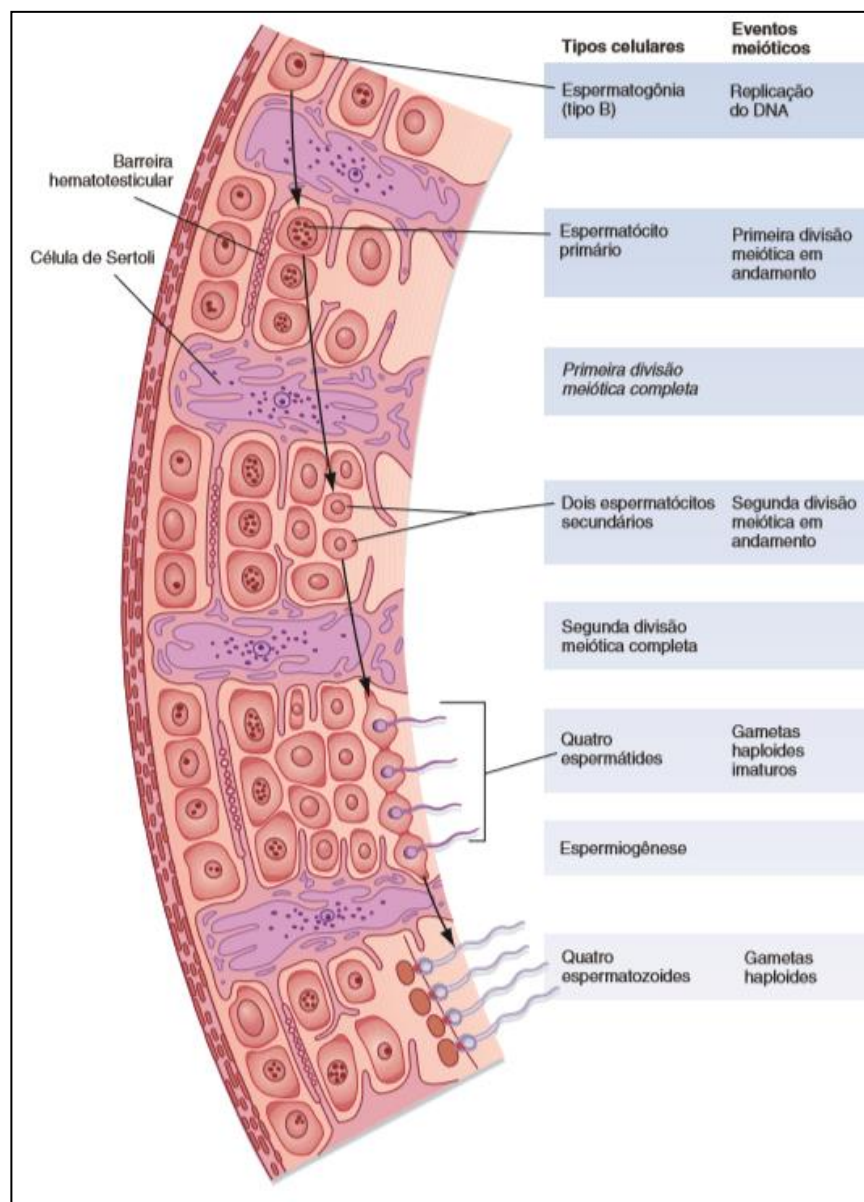


Figura 3- Interações entre células testiculares na regulação da espermatogênese. (Berne & Levy, 2009)

As células de Sertoli também têm função hormonal, sendo dependentes da testosterona produzida pelas células de Leydig e do Hormônio Folículo Estimulante (FSH), produzido pela hipófise para máxima produção de espermatozoides. Além disso, as células de Sertoli secretam a enzima CYP19 (também denominada aromatase), responsável pela transformação da testosterona em  $17\beta$ -estradiol, um potente estrógeno cuja produção dentro da célula de Sertoli aumenta a espermatogênese (Berne & Levy, 2009). Também produzem grande quantidade de fluido, proporcionando um meio adequado para manutenção dos espermatozoides e movimentação dos mesmos até o epidídimo, e fagocitam resíduos correspondentes ao citoplasma do espermatozoide, que foi descartado durante a espermiogênese. Finalmente, é importante mencionar que as células de Sertoli produzem a inibina, cuja secreção é estimulada pelo FSH, sendo responsável pelo *feedback* negativo, cessando a secreção de FSH pela hipófise.

Já as células de Leydig são células produtoras de esteróides no estroma testicular. Elas armazenam colesterol que, sob efeito do AMPc, é convertido em pregnenolona. Sob efeito da  $3\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase ( $3\beta$ -HSD), a pregnenolona se converte em progesterona, depois 17-hidroprogesterona, e depois, androstenediona. Após isso, a enzima  $17\beta$ -Hidroxiesteroide desidrogenase ( $17\beta$ -HSD) transforma a androstenediona em testosterona. (Berne & Levy, 2009).

## 2.4 Epidídimo

O epidídimo está anexado ao testículo e consiste em túbulos contorcidos alongados, unidos por tecido conjuntivo. Pode ser dividido em cabeça, corpo e cauda. A cabeça recebe os ductos eferentes do testículo, que se unem formando o corpo do epidídimo. O ducto do epidídimo prossegue até a cauda do epidídimo, fixada no testículo pelo ligamento próprio do testículo. No ducto do epidídimo, ocorre a maturação final dos espermatozoides, que são armazenados na cauda até que ocorra a ejaculação (König, 2011). As mudanças que ocorrem nos espermatozoides incluem uma redução adicional de citoplasma, maturação do acrossomo e habilidade de penetrar a zona pelúcida no ovócito (Seeley, 2011).

Os espermatozoides entram no epidídimo, impulsionados pelo fluido testicular e por cílios de células nos ductos eferentes (Crabo, 1965). Ocorre aumento gradual da pressão hidrostática dentro do epidídimo conforme o espermatozoide avança distalmente em direção à cauda (Johnson et al., 1975). O mecanismo primário responsável por esse acontecimento é a presença de musculatura lisa de densidade crescente, com contrações ritmadas ao longo de todo o túbulo epididimal (Robaire et al., 2006).

O epitélio do epidídimo é secretório, adicionando diversos componentes ao fluido seminal (Berne & Levy, 2009). Também tem função absorviva, captando os dejetos celulares expelidos pelos espermatozoides em maturação (Seeley, 2011). Esses dejetos celulares são expelidos em forma de uma gotícula citoplasmática, que desce da região da peça intermediária, sendo expelida na região do *annulus*. A presença dessa gotícula em muitos espermatozoides representa imaturidade (Hafez, 2013). O espermatozoide testicular não apresenta motilidade, sendo notado apenas um movimento descoordenado do flagelo. Ao se isolar espermatozoides da cabeça do epidídimo, sua motilidade é alterada, normalmente em movimentos circulares. Ao sair do epidídimo pela cauda, sua motilidade é unidirecional e vigorosa (Robaire et al., 2006). Esse padrão unidirecional de movimento começa a ser visto em alguns espermatozoides a partir do corpo do epidídimo, se tornando o padrão dominante na cauda (Hafez, 2013). A produção de um fator de quiescência impede o gasto desnecessário de energia pelos espermatozoides, mantendo-os imóveis ao reduzir suas atividades enzimáticas intracelulares (Ghosh et al., 2018).

Durante a espermiogênese, a cromatina do núcleo das espermatídes passa por um processo de compactação. Enquanto os espermatozoides passam pelo epidídimo, ocorre uma compactação adicional da cromatina (Hafez, 2013).

A habilidade de fertilização dos espermatozoides adquirida no epidídimo provém de uma série de fatores: (a) desenvolvimento de motilidade retilínea, (b) alterações de padrões metabólicos e estrutura de organelas específicas na cauda, (c) mudanças na cromatina nuclear, (d) mudanças na superfície da membrana plasmática, (e) migração e perda da gota citoplasmática e, (f) modificação da forma do acrossomo em, pelo menos, algumas espécies (Hafez, 2013).

## 2.5 O papel do Zinco na reprodução de machos

O zinco é um elemento importantíssimo na reprodução de mamíferos, sejam machos ou fêmeas. O zinco é necessário para a maturação de espermatozoides, para ovulação e para fertilização. Seus diferentes efeitos podem ser explicados pela ação múltipla no metabolismo de hormônios andrógenos, estrógeno, progesterona e prostaglandinas (Favier, 1992).

O zinco age como um cofator enzimático, se ligando a hormônios, conferindo-lhes uma configuração espacial ativa, ou modificando a forma de receptores para esses hormônios, seja na membrana ou no núcleo da célula. Sua suplementação melhora tanto a síntese quanto a absorção da testosterona. Além disso, a 5 $\alpha$ -redutase, responsável pela conversão da testosterona em dihidrotestosterona (DHT), é ativada por uma pequena quantidade de zinco, ainda que desativada na presença de zinco excessivo. Outro papel importante do zinco é na composição de todos os receptores nucleares para hormônios esteróides, além de ser necessário para os receptores na próstata aceitarem o DHT (Favier, 1992). Em ratos, foi encontrado zinco na cauda de espermatozoides, indicando que o zinco é essencial para a sua forma estrutural. Ratos com deficiência de zinco apresentaram muitas deformidades da cauda de espermatozoides além de concentração reduzida (Apgar, 1985).

Altos níveis de metalotioneínas estão presentes nos testículos de ratos adultos (Apgar, 1992). Essas enzimas protegem o organismo de intoxicação por metais pesados, tendo alta afinidade por alguns deles como zinco, cobre, cádmio, prata, mercúrio, ouro, níquel e cobalto. Zinco e cobre, apesar de essenciais para a vida, são tóxicos quando em alta quantidade (Hamer, 1986). Além de proteger o organismo da eventual intoxicação por zinco, acredita-se que essas proteínas distribuem zinco uniformemente pelo tecido (Martelli, 2006). Sua alta incidência em túbulos seminíferos pode ser explicada pela importância do zinco no sistema reprodutor masculino.



### 3. Métodos não cirúrgicos de esterilização

A técnica de esterilização ideal deve levar à esterilização completa do animal com um único tratamento, sendo seus efeitos permanentes, sem efeitos negativos no bem estar e produtividade animal e por um baixo custo. Deve ser fácil de realizar e ser específica ao animal tratado, sem afetar indivíduos não-alvo, seja da mesma espécie ou outra. Ela também deve ter um efeito consistente, suprimindo a gametogênese e regulando ou dissipando a síntese de esteróides que influenciem no comportamento (Jana & Samanta, 2011). Foram elaboradas diversas técnicas não-cirúrgicas ao longo dos anos, com intuito de baratear o processo e melhorar a recuperação das partes envolvidas, sendo também, menos traumáticas física e emocionalmente.

As técnicas não-cirúrgicas podem ser classificadas em terapia hormonal, imun contracepção e esterilização química (Lopes & Silva, 2014). A terapia hormonal promove apenas a suspensão temporária da fertilidade de animais em estágio de reprodução. Hormônios esteróides exógenos suprimem a fertilidade indiretamente através da inibição da secreção de gonadotrofinas (Kutzler & Wood, 2006). Esse método promove a infertilidade utilizando progestágenos, andrógenos ou agonistas de hormônio liberador de gonadotrofinas (Johnston et al., 2001). A Imunocontracepção é efetuada através de uma vacina que suprime a fertilidade de machos e fêmeas. Diversos alvos já foram identificados, como GnRH, LH, seus receptores, e antígenos espermáticos. (Kutzler & Wood, 2006). Por fim, a esterilização química envolve a injeção de agentes químicos nos testículos, epidídimos ou vasos deferentes, promovendo a infertilidade ao induzir azoospermia em animais machos. É uma técnica simples, barata e apropriada para a esterilização em larga escala tanto em animais domésticos quanto de vida livre (Jana & Samanta, 2011).

### 3.1 Castração hormonal

A regulação hormonal leva à supressão temporária da fertilidade via inibição da secreção de gonadotrofinas por parte da hipófise (Principalmente o LH) (Kutlzer & Wood, 2006). Usam-se progestágenos, andrógenos ou análogos do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) (Lopes & Silva, 2014)

#### 3.1.1 Progestágenos

Os progestágenos são fármacos análogos à progesterona. Embora sejam mais comumente usados como método anticoncepcional de fêmeas, o acetato de megestrol e o acetato de medroxiprogesterona (MPA) são alternativas relativamente populares para uso em machos (Lopes & Silva, 2014). Levam à teratozoospermia, sugerindo que o MPA tem efeito epididimal e, quando associado à testosterona, tem efeitos ainda mais rápidos (Johnston et al., 2001).

Os machos, como as fêmeas, são dependentes de LH e FSH para manter sua função gametogênica. Pelo mesmo princípio de *feedback* negativo da fêmea, os progestágenos exógenos suprimem a secreção de gonadotropinas em machos, levando a produção de espermatozoides defeituosos. (Kutzler & Wood, 2006). Doses orais diárias de MPA a 2mg/kg e 4mg/kg por sete dias falharam em surtir qualquer efeito na qualidade do sêmen de cães, mas uma administração subcutânea de 20mg/kg da droga produziram uma resposta em três dias com diminuição da motilidade, morfologia e concentração espermática (England, 1997). Progestágenos são contraindicados devido a alguns efeitos adversos, como supressão adrenocortical, alterações no metabolismo da glicose e desenvolvimento de tumores mamários ou outros tumores malignos de natureza diversa (Asa & Porton, 2005).

#### 3.1.2 Andrógenos

A administração de andrógenos exógenos é mais eficiente do que a de progestágenos. Administração de 5mg/kg de um composto constituído por diferentes ésteres andrógenos (0,6 mg de propionato de testosterona, 1,2 mg de fenilpropionato de testosterona, 1,2 mg de isocaproato de testosterona, e 2mg de

decanoato de testosterona) em cães machos resultou em uma grade diminuição da motilidade espermática, persistindo por 3 meses (England, 1997). Outros agentes efetivos, a metiltestosterona e o danazol, um derivado sintético da 17  $\alpha$ -etinil testosterona, resultaram em azoospermia em 60 dias. Esses efeitos são reversíveis em 60 dias (freshman et al., 1990; Dixit, 1977).

Além desses agentes, a prolactina em humanos é sintetizada pela hipófise. Em humanos, seu excesso causa oligospermia ou azoospermia. Em cães, a administração de prolactina levou a alterações evidentes nos túbulos seminíferos, porém, após três meses sem a droga, houve regeneração dos túbulos e os cães testados conseguiram engravidar fêmeas, que deram a luz, filhotes normais. As concentrações de FSH, LH e testosterona não foram alteradas com o tratamento e os autores sugerem que a prolactina tenha algum efeito diretamente nos testículos e não na regulação hormonal (Shafik, 1994).

Dos os efeitos colaterais associados ao uso exógeno de andrógenos, destacam-se dermatite seborreica, disfunções hepáticas, obesidade e mudanças comportamentais. Os andrógenos são contraindicados em animais pré-puberes, devido a alterações na conformação dos ossos que eles podem causar (Gray et al., 2001).

### **3.1.3 Análogos de GnRH**

Para que ocorra secreção de grandes quantidades de LH e FSH, a hipófise precisa ser exposta a uma série de breves aumentos e diminuições nos níveis de GnRH. Se administrado em pulsos freqüentes em pequena quantidade, ele auxilia no tratamento da infertilidade. Entretanto, níveis elevados de GnRH no sangue por períodos muito longos levam à dessensibilização da hipófise a seus estímulos, diminuindo a secreção de LH e FSH (Seeley, 2011). Tendo isso em mente, diversos análogos de GnRH foram desenvolvidos para suprimir a fertilidade. A exposição constante ao GnRH reduz a secreção de gonadotropinas através de dessensibilização dos receptores de GnRH na hipófise (Kutzler & Wood, 2006). Existem fármacos com diferentes apresentações, reversíveis com a suspensão do

tratamento (Bowen, 2008), assim como implantes, já testados em cães (Ludwig., 2009) e furões (Schoemaker et al., 2008).

A deslorelina é bastante comum, tendo seu próprio produto comercial, disponível na Austrália e Nova Zelândia (Suprelorin®, Peptech Animal Health). Trata-se de um implante, cujo fabricante alega resultar em esterilização por no mínimo 6 meses em 98% dos cães (Kutzler & Wood, 2006). Estudos com implantes de deslorelina reduzem a concentração plasmática de testosterona e LH a níveis indetectáveis dentro de 6 semanas, voltando ao normal após 60 semanas (Junaidi et al., 2003).

Além da deslorelina, injeções subcutâneas diárias de nafarelina na dose de 2µg/kg/dia diminuem a concentração basal de testosterona até alcançar a infertilidade dentro de 3 semanas. A fertilidade foi restaurada oito semanas após a pausa do tratamento (Vickery et al., 1985; Goodpasture et al., 1988).

Apesar de eficientes, os métodos hormonais são impróprios para o controle populacional. É preciso se lembrar de que o método contraceptivo ideal deve ser permanente, e o tratamento só deve precisar ser feito uma única vez (Jana & Samanta, 2011). Nenhum dos métodos hormonais é permanente, necessitando uma nova administração após um determinado período. Esses métodos são eficientes para cães de proprietários que desejam a reprodução de seus animais, mas não querem comportamentos sexuais como a monta ou demarcação de território. Isso é ainda mais importante onde há criação de animais para venda, quando a monta deve ser controlada e conflitos entre os animais devem ser evitados ao máximo.

Ainda assim, o método mais indicado dentre os hormonais é o uso de análogos de GnRH. Progestágenos são totalmente contraindicados devido a efeitos colaterais severos, enquanto andrógenos não devem ser usados em filhotes pré-púberes devido à interferência na formação dos ossos, ainda ocorrendo efeitos colaterais em adultos como obesidade, dermatite seborreica e um efeito que vai contra o desejo da maioria dos proprietários: A maior expressão das características comportamentais como demarcação de território, agressividade e monta (Lopes & Silva, 2014).

Os análogos de GnRH não tem efeitos colaterais conhecidos e costumam ser eficientes na maioria dos cães. A confiança nesses agentes é tanta que foi desenvolvido um produto comercial a base de deslorelina para cães, que supostamente é eficiente em 98% dos cães por até 6 meses (Kutzler & Wood, 2006)

Apesar de não ser o foco desse trabalho, a castração hormonal pode ser considerada um método válido de conseguir a esterilização do animal se for o desejo do proprietário que essa seja temporária.

### **3.2 Imunocontracepção**

A imunocontracepção consiste no uso de vacinas, que irão levar o organismo a criar anticorpos contra o GnRH ou o LH (Lopes & Silva, 2014). Seu uso já foi testado em potros (Dowsett et al., 1991), em cães (Gonzalez et al., 1989), gatos (Ladd et al., 1994) e em animais de produção (Pirard Et al., 2001). Diversos candidatos alvos para essas vacinas já foram identificados, incluindo GnRH, LH, receptores pra LH, antígenos espermáticos e, em fêmeas, a zona pelúcida dos ovócitos (Kutzler & Wood, 2006).

#### **3.2.1 Imunização contra o GnRH**

O desenvolvimento de uma vacina contra o GnRH é difícil. Ele não é naturalmente imunogênico, por ser um pequeno decapeptídeo com conformação relativamente semelhante entre todos os mamíferos. Então, sob condições normais, o GnRH é facilmente reconhecido pelo sistema imune como tecido próprio. Por isso, uma vacina derivada de GnRH nativo não resulta em nenhuma resposta a antígenos e, se resultar, ocorre apenas uma resposta fraca e pouco duradoura, já que o animal é tolerante aos próprios hormônios (Kutzler & Wood, 2006). Entretanto, o GnRH pode ser alterado o suficiente para ser reconhecido como material estranho, ao ser conjugado junto a alguma outra molécula que possua diversos determinantes antigênicos, desencadeando uma resposta de IgG (Mitchison, 1971).

Foi possível alcançar perda da função testicular em cães com a fusão do GnRH e o epítipo p35 de células T auxiliares originadas do contato com a proteína

F presente no vírus da cinomose (Jung et al., 2005). A vacinação de cães machos com toxinas tetânicas conjugadas a GnRH teve efeitos similares, levando a testosterona a níveis de castração em 4 semanas. Esses efeitos eram revertidos quando os títulos de anticorpos decaíam. Essa mesma vacina em gatos machos não resultou em infertilidade, pois a taxa de anticorpos não era tão alta (Ladd et al., 1994).

Atualmente, alguns produtos com formulação baseada em GnRH existem no mercado, como o Improvest®/Improvac® (Zoetis, NJ, USA), aprovado para uso em suínos machos com o objetivo de prevenir a reprodução e o cheiro desagradável de porcos criados para abate. Contem um análogo incompleto de GnRH conjugado com DEAE-dextran como um adjuvante. Outro produto utilizado é o Bopriva®, com uso indicado para bovinos. A diminuição da testosterona e o atraso do desenvolvimento testicular em touros jovens são observadas seis semanas após a injeção (Jannet et al., 2012). Diversos outros produtos existem, mas seu uso é especialmente voltado para fêmeas (Naz & Saver, 2016).

Vacinas de GnRH não causam nenhum efeito adverso indesejável em machos ou fêmeas. Pelo contrário, animais vacinados de diversas espécies apresentaram melhores condições corporais do que os animais não vacinados.

### **3.2.2 Imunização contra o LH**

Pineda et al (1967) descreveu a imun contracepção contra LH bovino em coelhos machos e fêmeas, obtendo bons resultados. Os estudos em cães também foram bem-sucedidos (Lunnen et al., 1974). A função reprodutiva de cães vacinados contra o LH foi fortemente debilitada por até um ano utilizando uma vacina contendo LH bovino purificado, ocorrendo atrofia dos testículos, epidídimos e próstata.

### **3.2.3 Imunização contra antígenos espermáticos**

Os antígenos espermáticos são um alvo excelente para imun contracepção, pois suas proteínas já são vistas pelo organismo como “invasoras” tanto para machos quanto para fêmeas (Talwar & Naz, 1981). Esses

anticorpos afetam tanto a fertilização quanto a fertilidade. Entretanto, o espermatozoide inteiro não pode ser usado para o desenvolvimento da vacina, pois divide diversos antígenos com outras células somáticas, o que poderia desencadear em uma resposta auto-imune perigosa (Naz et al., 2005). A busca por antígenos específicos presentes no espermatozoide resultou no uso da lactato desidrogenase (LDH-C4) e da acrosina como os principais antígenos (Talwar & Naz, 1981), mas até agora, nenhum resultado satisfatório no controle da fertilidade foi obtido (Naz et al., 2005).

Os resultados com a vacina contra LH bovinos (Lunnen et al., 1974) foram incrivelmente variáveis, tendo retorno da função reprodutiva dos cães testados em 15 a 52 semanas, demonstrando a falta de confiabilidade da técnica para controle populacional.

Jana & Samanta (2007) também mencionam que as técnicas de imunização variam quanto à efetividade e duração da azoospermia. Também mencionam as reações adversas a vacina observadas como uma desvantagem do método.

Um estudo em ratos demonstrou que imunização com um peptídeos de GnRH inserido em uma vacina com o vírus da raiva induziu altos níveis de anticorpos, garantindo a proteção contra a raiva (Wu, et al., 2009). Isso indica a possibilidade de desenvolver uma vacina combinando a esterilização sexual e a imunidade contra raiva. Porém, talvez fosse melhor implementar uma técnica mais confiável para promover a esterilização desses animais, devido à inconfiabilidade da imun contracepção.

Como a castração hormonal, a imun contracepção apresenta resultados bons para animais em ambiente controlado, mas apesar de baixa taxa de efeitos colaterais, sua efetividade é temporária, tornando a técnica uma candidata inadequada para o controle de populações de animais de rua.

### 3.3 Castração química

A castração química é um procedimento não invasivo que promove alterações definitivas nas estruturas do aparelho reprodutor masculino, levando à redução total ou parcial da produção de espermatozoides, sendo um método mais barato e mais seguro, comparado a métodos cirúrgicos tradicionais, mesmo sem atingir os mesmos níveis de eficácia (Lopes & Silva, 2014). Refere-se ao uso de elementos que geram inflamação, fibrose e dano às estruturas do aparelho reprodutor masculino. Um agente ideal deve ser seguro, efetivo, barato, permanente, eficaz com uma única injeção e com efeitos previsíveis no comportamento e na saúde (Jana & Samanta, 2011). No caso de animais para consumo humano, esse agente ainda não deve deixar nenhum resíduo que alteraria a qualidade da carne (Cavalieri, 2017).

Diversas substâncias com potencial como agente esclerosante foram descobertas nos últimos 60 anos, mas três se destacaram acima dos outros:

**Cloreto de cádmio:** Provavelmente o primeiro agente esclerosante com sinais testiculares a ser descoberto. Alguns pesquisadores ainda estudam seus efeitos (Da Costa et al. 2002; Ribeiro, 2013), mas não é mais usado hoje em dia por ser considerado muito perigoso e instável (E. Cameron et al., 1963; Martelli, 2006). Sua descoberta deu início a uma busca por agentes igualmente eficientes, que não causassem os mesmos efeitos colaterais (Kamboj & Kar, 1963).

**Zinco:** Um metal muito presente no organismo, de suma importância no líquido seminal (Hidiroglou, 1984). Ao tentar explicar o mecanismo de ação do cádmio, é impossível não falar do zinco (Parízek, 1960), já que ambos os metais são intimamente correlacionados, sendo um confundido com o outro pelo organismo. Ganhou destaque entre os outros princípios sendo o único a ser lançado como produto comercial na forma do gluconato de zinco (Lopes & Silva, 2014).

**Cloreto de Cálcio:** O cloreto de cálcio já se mostrou eficiente em diversas espécies, utilizando-se diferentes veículos, concentrações distintas e volumes proporcionais à massa testicular (Koger, 1978). Seu uso inicial era como tratamento para hipocalcemia em bovinos, sendo notada sua capacidade de causar necrose em



tecidos vizinhos quando administrada perivascularmente e seu potencial como agente esterilizante (Koger, 1977).

### 3.3.1 Cloreto de cádmio ( $\text{CdCl}_2$ )

Os efeitos farmacológicos do cloreto de cádmio ( $\text{CdCl}_2$ ) foram descritos em diversos órgãos (Alsberg, C. L. & Schwartz, E. W, 1919) inclusive nos testículos, em que era notada uma “descoloração azulada”(Alsberg & Schwartz 1919, Schwartz & Alsberg, 1923) e hiperemia em um experimento envolvendo coelhos (Hessel, 1926). As lesões macroscópicas nos testículos só foram descritas mais tarde em um estudo feito com ratos (Parížek & Zárok, 1956). Já dentro das primeiras horas após injeção subcutânea de cloreto de cádmio na região interescapular de ratos, ocorre aumento considerável dos testículos e, ao corte da túnica albugínea, há secreção de um líquido turvo, característico de edemaciação. Horas após, os testículos adquirem uma coloração avermelhada, que prossegue para violeta ou azulada. Conforme os dias avançam, os testículos diminuem de tamanho e se tornam tecido fibroso firme (Figura 4).



Figura 4 - Testículos de ratos adultos (esquerda pra direita) antes da injeção, 12 horas, 11 dias e quatro meses após a injeção de 0,04 mMol de  $\text{CdCl}_2$  por kg de peso vivo (Parížek, 1960).

Na histologia, é possível perceber a aparição dos sinais inflamatórios logo nas primeiras horas: Inicialmente no lúmen dos túbulos seminíferos, mas progredindo até a lâmina basal, demonstrando sinais de descamação e alterações nos núcleos celulares. No interstício, são encontrados sinais de edema, hiperemia e, mais tarde, trombos e hemorragias, além de infiltrado celular que progridem até alcançar a necrose total do tecido (Parízek & Zárok, 1956). Na realidade, o sinal clínico mais comum nos estudos de intoxicação com  $\text{CdCl}_2$  foi a necrose total dos testículos (Figura 5), que pode ser alcançada com doses subcutâneas de até 0,02 mMol/kg em ratos (Parízek, 1957, 1960).

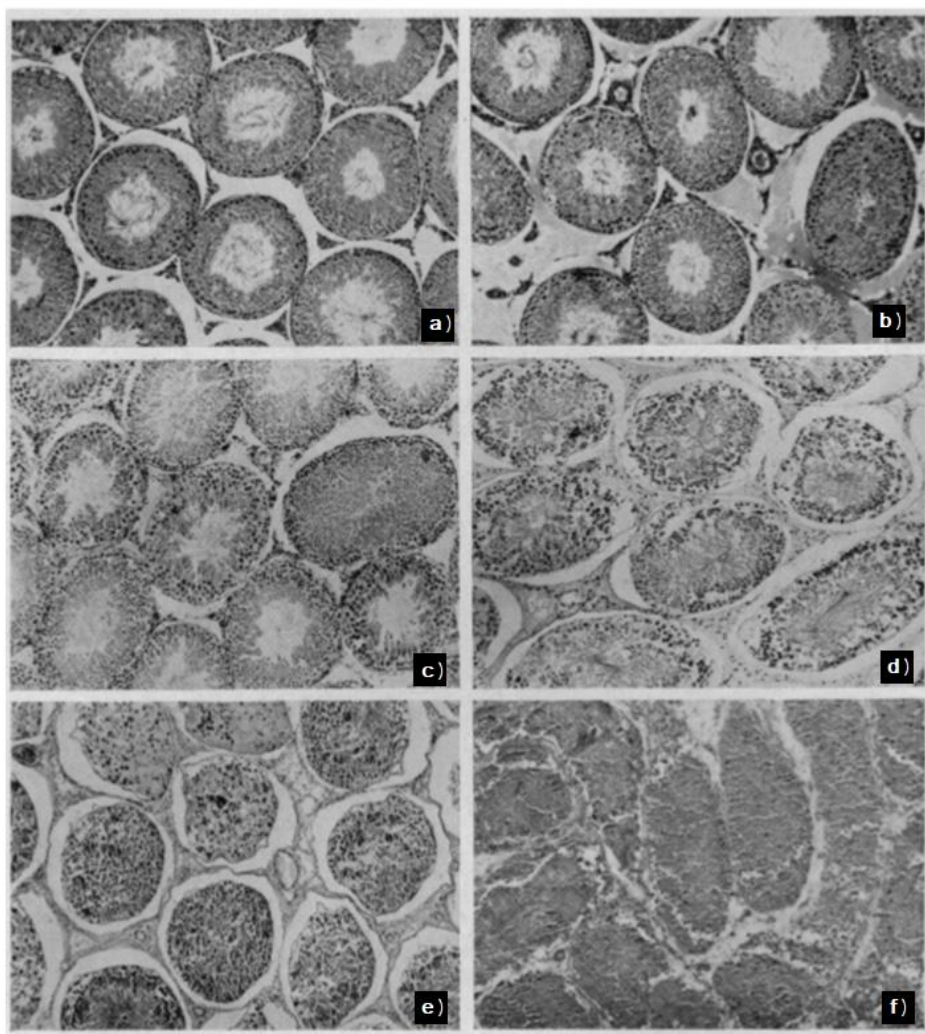


Figura 5 - Desenvolvimento de necrose testicular em ratos adultos causados pela administração subcutânea de cloreto de cádmio ( $\text{CdCl}_2$ ) na dose de 0,04mMol/kg.a) Antes da injeção. b) Seis horas após a injeção – Pequenas mudanças no lúmen tubular, edema intersticial. c) Doze horas após a injeção – Dano nas células adjacentes ao lúmen tubular, mudanças circulatórias no interstício. d) 24h após a injeção – alterações em células adjacentes à membrana basal, discreta infiltração celular no interstício. e) 48h Após injeção – Completa destruição dos túbulos seminíferos, trombose no interstício. f) 10 dias após injeção – Completa necrose testicular. 60x (Parízek, 1960).

Além das mudanças histológicas, há estudos sobre os efeitos endócrinos da castração com CdCl<sub>2</sub>. Estudos *in vitro* demonstram que as células de Leydig são afetadas pelo cádmio. A ativação da glutathione peroxidase (GSH-Px) aumenta significativamente, mas a atividade da superóxido dismutase (SOD) diminui. O dano oxidativo afeta severamente o DNA das células de Leydig, levando a uma redução da produção de testosterona (Yang et al, 2003). A habilidade dos testículos de sintetizar testosterona cai para 0,3% após dez dias da administração do CdCl<sub>2</sub>, mas após 100 dias sobe para 1,9% e para 12% após 150 dias. Enquanto isso, a concentração de androstenediona cai para 6% em relação ao controle nos primeiros dez dias, mas após 100 dias, alcança níveis extremamente elevados, alcançando valores dez vezes maiores do que os encontrados nos controles. Na verdade, a necrose testicular não é total. Uma pequena quantidade de células de Leydig margeando a túnica albugínea tendem a sobreviver. Essa regeneração pode ser em parte, devido à hipertrofia das células de Leydig remanescentes, cuja atividade estava presumidamente aumentada devido à maior disponibilidade de LH e FSH (Favino et al, 1966). Altas concentrações de gonadotrofinas *in vivo* são responsáveis pelo aumento da secreção de androstenediona em vez de testosterona (Hall & Eik-Nes, 1963) em testículos de ratos. Ainda assim, é possível que a diminuição da relação testosterona : androstenediona seja devido a alguma anormalidade na enzima 17 $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase, responsável pela conversão da androstenediona em testosterona.

O cádmio, até em concentrações mínimas, é extremamente tóxico em humanos, cães, coelhos, ratos e camundongos. Doses de até 18mg/kg por via subcutânea e de 5mg/kg por via intravenosa, são letais em coelhos (Gilman & Phillips, 1946). Se ingerido, uma parte por milhão de cádmio é capaz de desacelerar ou até parar os batimentos cardíacos de um sapo, 250 partes por milhão são capazes de matar ratos e uma parte em trezentos mil é capaz de matar protozoários (Wilson et al., 1941). Os efeitos produzidos pela injeção subcutânea são variados, de acordo com a espécie do animal submetido à injeção, sua idade e estado nutricional. Em um estudo (E.Cameron, 1963), foram utilizados coelhos, com o objetivo de repetir os estudos de Parízek, (1963) em outro animal e com diferentes doses. Nem todos os animais tiveram os mesmos danos testiculares extensos que Parízek

encontrou, demonstrando que o cádmio é imprevisível. Além disso, alguns animais morreram com uma única injeção de 10,6-18mg/kg em 1 a 8 dias, enquanto outros toleravam múltiplas administrações até chegar aos 21 dias do experimento. Desses que sobreviveram, em alguns, não houve nenhum sinal de dano testicular. Nesse mesmo estudo, um grupo de ratos foi submetido a doses de 9mg/kg, e os resultados de Parízek se repetiram. Isso demonstrou que diferentes espécies tinham diferentes tolerâncias ao cádmio pela via subcutânea, reforçando mais ainda o quão imprevisível era esse metal.

Outras lesões importantes são: lesões renais (principalmente nos túbulos contorcidos proximais), que levam à anemia e eosinofilia devido à diminuição da liberação de eritropoietina (Martelli, 2006), perda de apetite com conseqüente perda de peso (sinal de que o cádmio estava sendo absorvido e produzindo efeitos que podiam ou não envolver o testículo), esplenomegalia, alterações no citoplasma de hepatócitos (E. Cameron, 1963), atrofia e inflamação do pâncreas e hipertrofia do coração devido à anemia crônica (Wilson, 1941)

Ainda há relatos de potencial carcinogênico. Uma pequena neoplasia foi encontrada na região extra capsular da rede testicular em um coelho experimental (E. Cameron, 1963) e 15 ratos em um grupo de 20 desenvolveram tumores com injeções de 0,014g a 0,028g de cádmio em pó (Heath et al., 1962). Uma única injeção subcutânea de cloreto de cádmio foi suficiente para causar neoplasias prostáticas com elevada incidência no período de dois anos em ratos Wistar machos mesmo com uma dose suficientemente baixa para não levar à toxicidade testicular (Waalkes et al, 1988).

Em humanos, o cádmio está listado como um potencial causador de câncer de pulmão quando inalado. Além disso, também pode estar relacionado a outros tipos de câncer, mas não há muitos estudos sobre isso (Martelli, 2006). Alguns estudos (Lewis, 1972; Kolonel, 1976; Goyer et al, 2004) denotaram que o cádmio está presente em parte da nossa alimentação e em quantidades elevadas no cigarro. Esses estudos tentaram traçar um paralelo entre a intoxicação por cádmio e o surgimento de outras neoplasias, mas os resultados foram pouco significativos, sendo dependentes de diversos fatores que podem ou não, influenciar nas conclusões.

Para evitar os efeitos sistêmicos da intoxicação por cádmio, Kar & Das (1962), sugeriram em um estudo envolvendo ratos, coelhos, bodes e macacos, que uma única injeção por via intratesticular, além de mais confiável, também necessitava de uma dose muito menor para alcançar os resultados desejados, não passando de 200µg. Esse método se provou eficiente até em coelhos, que apresentavam uma resistência natural à intoxicação por cádmio (E. Cameron 1965). Enquanto Kar & Das (1962) encontraram regeneração das células de Leydig nos ratos, nenhum dos estudos encontrou esses sinais em coelhos. Esse alto índice de regeneração leva quase sempre a um quadro de neoplasia intersticial das células de Leydig em aproximadamente um ano em ratos e camundongos (Gunn et al, 1963; Waalkes et al., 1988). Essas células de Leydig têm seu funcionamento alterado, sendo possível notar pela função e tamanho diminuídos das glândulas acessórias (Gunn et al, 1963).

Estudos (Da Costa et al, 2002) fizeram uso do cádmio com o intuito de promover maior ganho de peso em bubalinos sem precisar arcar com os custos de uma castração cirúrgica, obtendo resultados satisfatórios. Ainda assim, seria necessário estudar sobre como isso afetaria a qualidade da carne, pois se sabe que o cádmio altera as propriedades de diversas enzimas, e dificilmente se desliga delas (Martelli, 2006), tornando plausível a possibilidade de o cádmio ser ingerido através da carne e levando a novos quadros de intoxicação em seres humanos.

Apesar da sua comprovada eficiência para levar à necrose testicular em ratos (Parízek, 1956, 1957, 1960), o cádmio é um metal imprevisível cuja eficiência é multifatorial, de acordo com espécie, idade e estado nutricional do indivíduo (E. Cameron, 1963). Além de sua imprevisibilidade, o cádmio é um veneno letal, relacionado à carcinogênese (E. Cameron, 1963). Isso torna o cádmio um metal incrivelmente arriscado para ser usado em grande escala.

### 3.3.2 Zinco

Apesar dos efeitos reprodutivos da deficiência de zinco estarem bem consolidados, seu excesso também pode causar alterações por toxicidade (Fosmire, 1990). No sistema reprodutor, o zinco tem grande importância na síntese de proteínas receptoras de gonadotrofinas hipofisárias e enzimas conversoras de testosterona em Di-hidrotestosterona, sem as quais seria impossível desenvolver as características sexuais primárias e secundárias (Favier, 1991), além de ser parte integrante do sêmen (Oliveira et al, 2007). O plasma seminal e os tecidos envolvidos com sua produção têm uma quantidade de zinco superior a qualquer outra parte do corpo (Fahim et al, 1993).

Diferente de outros agentes há bastante confiança no zinco por parte do mercado farmacológico, na forma do Gluconato de Zinco. Diversos produtos comerciais a base de Gluconato de Zinco com propósito de levar à infertilidade estão disponíveis no mercado, como o Testoblock® (BioRelease Technologies, Birmingham, AL, USA; Oliveira et al., 2011), Neutersol® (Pet Healthcare International, Inc., Columbia, MO, USA; Wang, 2002), que ficou indisponível por alguns anos e retornou com o nome de Esterilsol® nos EUA e Zeuterin® no resto do mundo (Ark Sciences, New York, NY, USA; Massei e Miller, 2013) e o Infertile® (Rhobifarma, Hortolândia, SP, Brasil; Soto et al., 2009), com composições, concentração e veículos diferentes (Lopes & Silva, 2014).

Em cães, estudos feitos com injeções na cauda do epidídimo (Fahim et al, 1993) mostraram resultados interessantes: Foi usada Zinco arginina na dose de 50mg em cães adultos, sendo observada azoospermia nos primeiros 3 meses, que se manteve durante o período de 1 ano de acompanhamento do experimento (Figura 6).

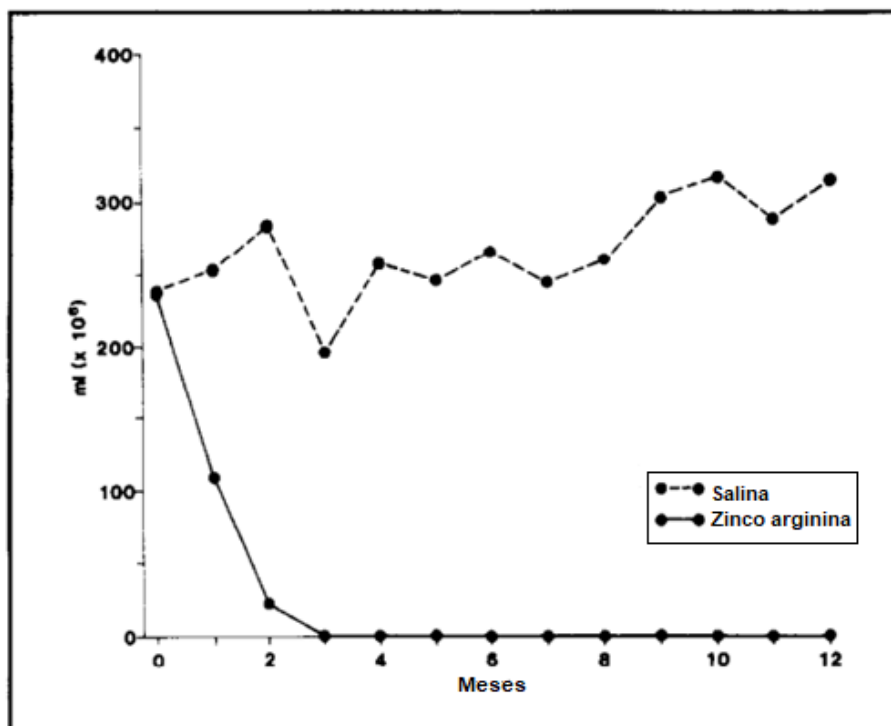


Figura 6 - Efeitos da injeção intraepididimal de 50mg de zinco arginina no número de espermatozoides presentes no ejaculado no período de um ano (Fahim et al, 1993)

Na avaliação histológica dos testículos e epidídimos, foi revelado que a estrutura dos testículos permanecia intacta, com presença de espermatozoides normalizada (Figura 7), mas a rede testicular estava atrofiada (Figura 8). Os epidídimos também apresentavam fibrose e atrofia, especialmente na área da cauda, sem a presença de nenhum espermatozoide, o que indica que o canal de transporte de espermatozoides dos testículos para os ductos deferentes estava bloqueado. Não houve diferença na concentração sérica de testosterona, nem no peso das glândulas anexas e testículos entre o grupo controle e o grupo tratado. Também foi relatado que nenhum dos animais sentiu desconforto ou dor durante o experimento. Houve aumento de volume testicular durante as primeiras 24-48h pós-injeção, o que se normalizou após cinco dias.



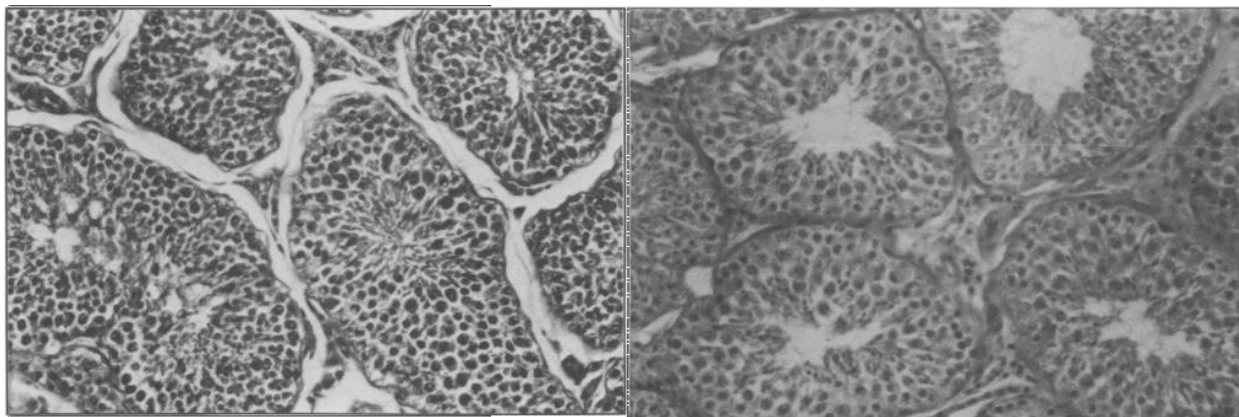


Figura 7 - À esquerda - túbulos seminíferos intactos do grupo controle. Epitélio germinativo com várias camadas e presença de espermatozoides. A direita - Túbulos seminíferos do grupo tratado com 50mg de zinco arginina por via intrapedidimal. Não há diferença do grupo controle. Epitélio germinativa em várias camadas e presença normal de espermatozoides. (Fahim et al, 1993)

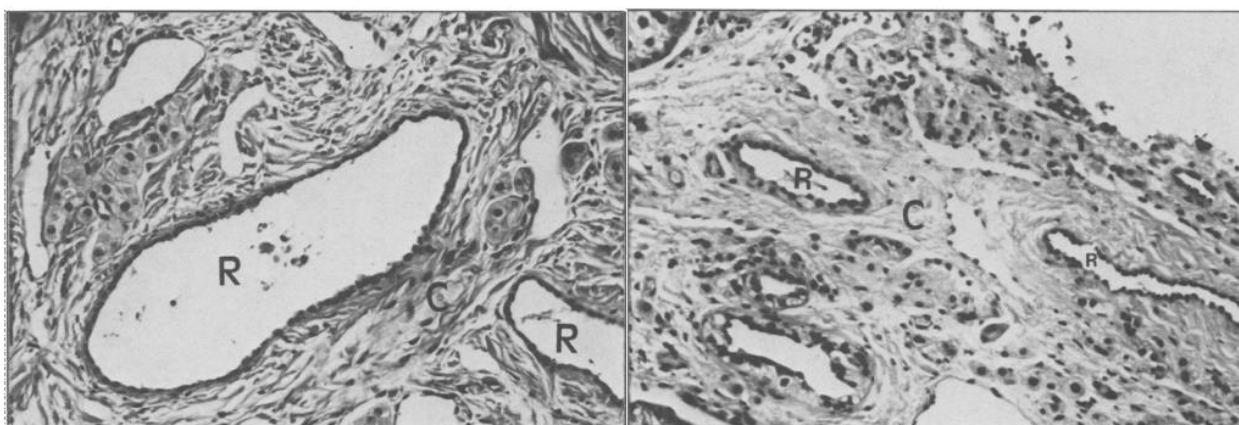


Figura 8 - Grupo controle (solução salina) à esquerda e grupo tratado (Zinco arginina 50mg) à direita. O diâmetro da rede testicular (R) diminuiu significativamente em relação ao grupo controle, além do aumento de tecido conectivo (C) envolvendo a estrutura do grupo tratado em relação ao grupo controle. (Fahim et al, 1993)

Wang (2002) avaliou os efeitos da injeção intratesticular de Gluconato de zinco neutralizado por arginina (Neutersol) em cães com idade entre 3 e 10 meses, encontrando necropermia e azoospermia em 60 dias na maioria dos animais, mas sem descrição detalhada dos efeitos hormonais nem da histopatologia. Oliveira et al (2007) realizaram um experimento com um produto comercial similar, a base de gluconato de zinco neutralizado por arginina, recém lançado (Testoblock®), com ênfase nos achados histopatológicos. Os resultados foram exatamente o inverso dos estudos de Wang (2002), estando os túbulos seminíferos dos grupos tratados degenerados enquanto a rede testicular e o epidídimo permaneciam intactos. A análise histológica demonstrou degeneração e diminuição da quantidade de células da linhagem germinativa com formação de células gigantes multinucleadas, vacuolização das células formando o túbulo seminífero e ausência de espermátides



alongadas nos túbulos acometidos nos dois grupos tratados. Vacuolização nas células de Leydig e algumas células de Sertoli demonstraram degeneração lipídica. As áreas mais próximas do local da administração apresentavam formação intensa de tecido cicatricial com atrofia dos túbulos seminíferos (Figura 9).

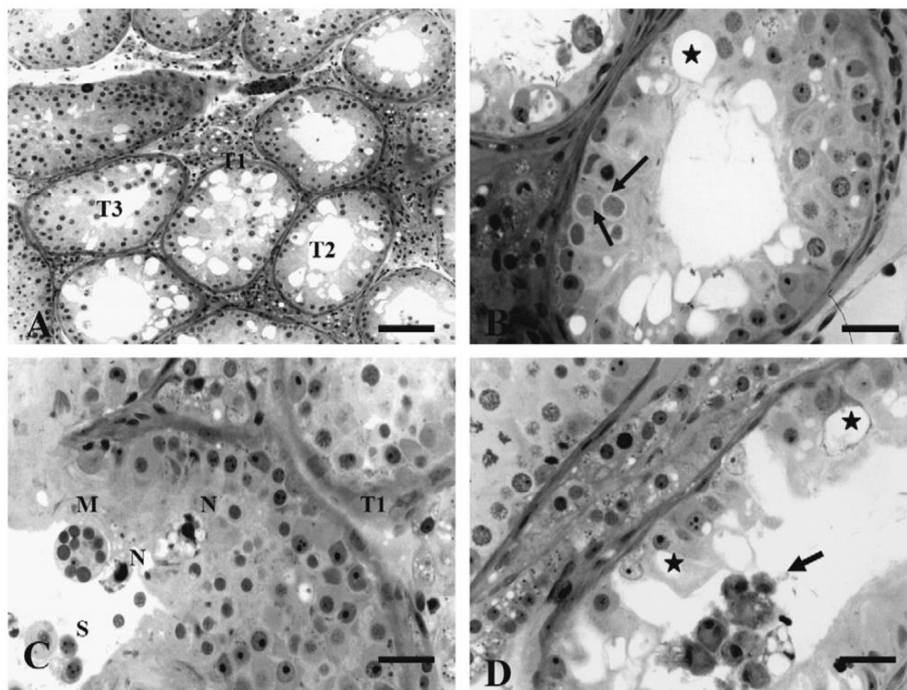


Figura 9 - Análise histológica por microscopia de luz em testículo de cão cinco meses após injeção intratesticular de solução de Gluconato de Zinco. (A) Vários níveis de dano tubular são perceptíveis. Túbulos seminíferos com descamação (T1), vacuolização de células de Sertoli (T2) e poucas células germinativas (T3). (B) Túbulo seminífero com perceptível vacuolização (estrela) Necrose de espermatócitos (flecha) e ausência de espermatídes redondas. (C) Células gigantes multinucleadas (M), espermatídes redondas necrosadas (N) e descamação de espermatídes (S). (D) Túbulo seminífero com descamação de células necróticas no lúmen (flechas) com vacuolização de células de Sertoli (estrelas). (Oliveira et al, 2007)

A castração química com Esterilsol® teve efeitos variáveis no perfil hormonal dos animais estudados (Vanderstichel et al, 2015). O nível sérico de testosterona de 66% dos animais testados permaneceu inalterado e indistinguível em relação ao grupo controle, mas em contrapartida, o nível de testosterona da maioria dos outros cães chegou ao nível de cães castrados por orquiectomia. Em um cão, o nível de testosterona abaixou bastante, mas voltou ao nível normal posteriormente.

Em gatos, os estudos com o gluconato de Zinco são relativamente recentes e poucos (Oliveira et al, 2013, Fagundes et al, 2014). Como em cães, ocorre aumento da largura do testículo por volta de 1 dia após a injeção,

provavelmente devido a uma leve inflamação, que regride rapidamente. Mas diferente dos cães, a largura testicular dos gatos tende a regredir abaixo dos parâmetros normais em 60 a 120 dias e ficar até 30% menor do que os controles (Figura 10) (Oliveira et al, 2013).

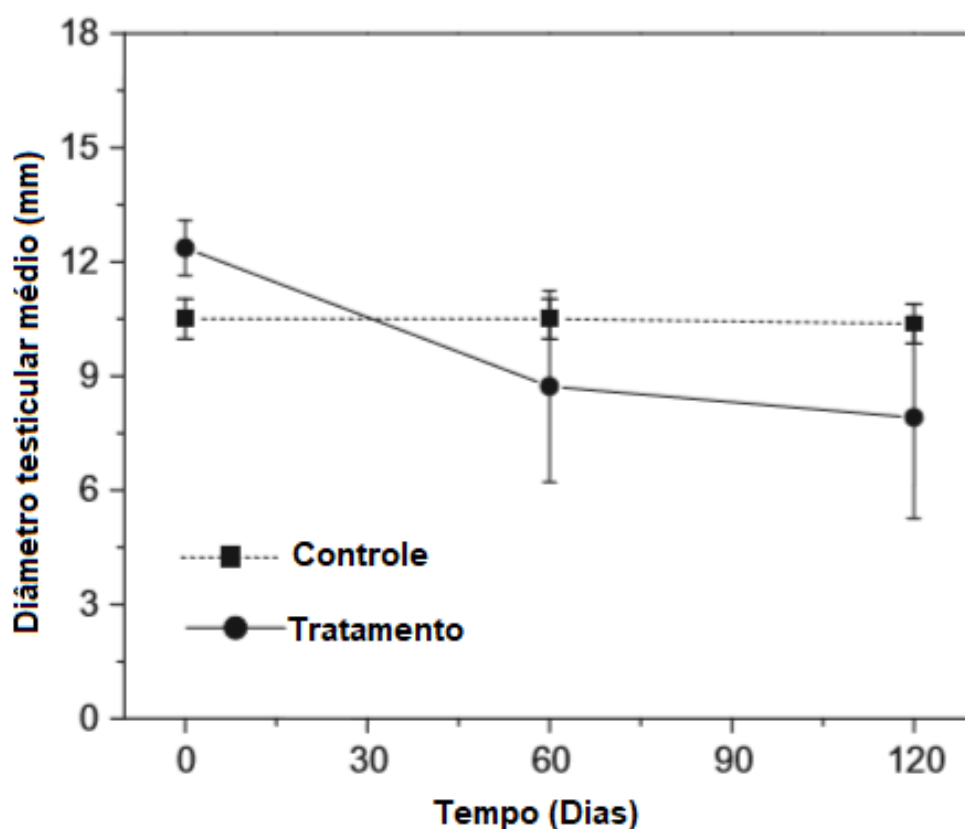


Figura 10 - Largura testicular de gatos após injeção com solução salina (Controle, n=5) ou gluconato de Zinco (Tratados, n=11) no período de 120 dias. Os gatos tratados apresentaram uma redução na largura testicular ( $P<0,05$ ) do dia 60 até o fim do estudo. (Oliveira et al, 2013)

Os espículos penianos dependentes de testosterona podem regredir ou desaparecer completamente (Figura 11) na maioria dos casos. As características comportamentais como ronda, agressividade e demarcação de território também tendem a se reduzir (Oliveira et al, 2013).



Figura 11 - Espículos de pênis de gato ausentes 120 dias após injeção com gluconato de Zinco. (Oliveira et al, 2013).

A injeção de gluconato de zinco em felinos levou à azoospermia aos 60 dias em 91% (10/11) dos animais (O animal remanescente teve redução significativa na quantidade e motilidade espermática). Mas aos 120 dias, 2 desses casos apresentavam necrospermia, abaixando a porcentagem de azoospermia a 73% (8/11), enquanto o animal que não apresentava azoospermia no dia 60 não demonstrou nenhuma melhora (Oliveira et al, 2013).

À avaliação histológica (Figura 12), são encontrados túbulos seminíferos dilatados e atrofiados. Também foi constatada diminuição na quantidade de células germinativas e espermatogênese incompleta. Vacuolizações de diversos graus são encontradas nas células de Sertoli enquanto fibroblastos ativos, depósitos de colágeno e células imunológicas estão presentes no tecido intertubular. O diâmetro dos túbulos seminíferos também diminui e a altura do epitélio dos túbulos seminíferos, é significativamente reduzida (Fagundes et al, 2014).

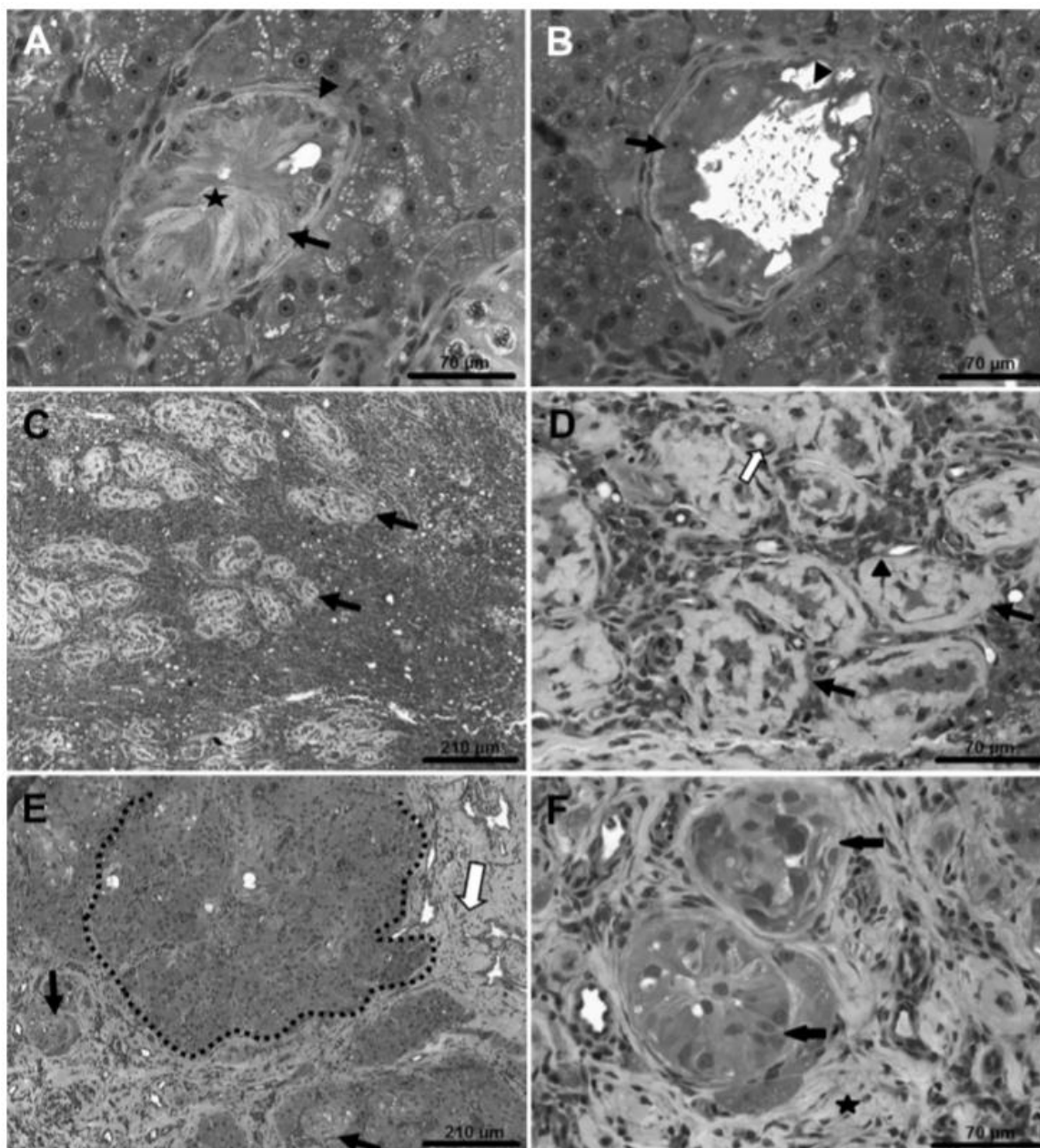


Figura 12 – Testículos de felinos 120 após injeção intratesticular de Gluconato de Zinco. (A) Corte transversal de túbulo seminífero demonstrando ausência de células germinativas no compartimento adluminal (estrela), poucas células da linhagem germinativa no compartimento basal (seta) e espessamento da membrana basal (Ponta de seta). (B) Túbulo seminífero contendo principalmente células de Sertoli (seta) com vacuolização do citoplasma (ponta de seta). (C) Formações hialinas no tecido intertubular (seta). (D) deposição de colágeno em formações circulares (seta). Fibroblastos em diferentes estágios de ativação, células inflamatórias e vasos sanguíneos podem ser vistos (seta branca). (E) Grupo de células de Leydig (Linha pontilhada) envoltos por colágeno (seta branca) e túbulos seminíferos atrofiados (seta). (F) Dois túbulos seminíferos atrofiados (seta) e depósitos de colágeno (estrela) envolvendo o ducto. Também é possível ver vasos sanguíneos. (Fagundes et al, 2014)

A análise com microscopia eletrônica de transmissão (Figura 13) demonstra perda de cromatina por parte das células de Leydig e gotas lipídicas associadas à vacuolização, além de sinais de cariólise, perda de mitocôndrias e



observação dificultada do limite entre as células próximas. Essas alterações são similares às alterações observadas em células passando pelo processo de necrose.

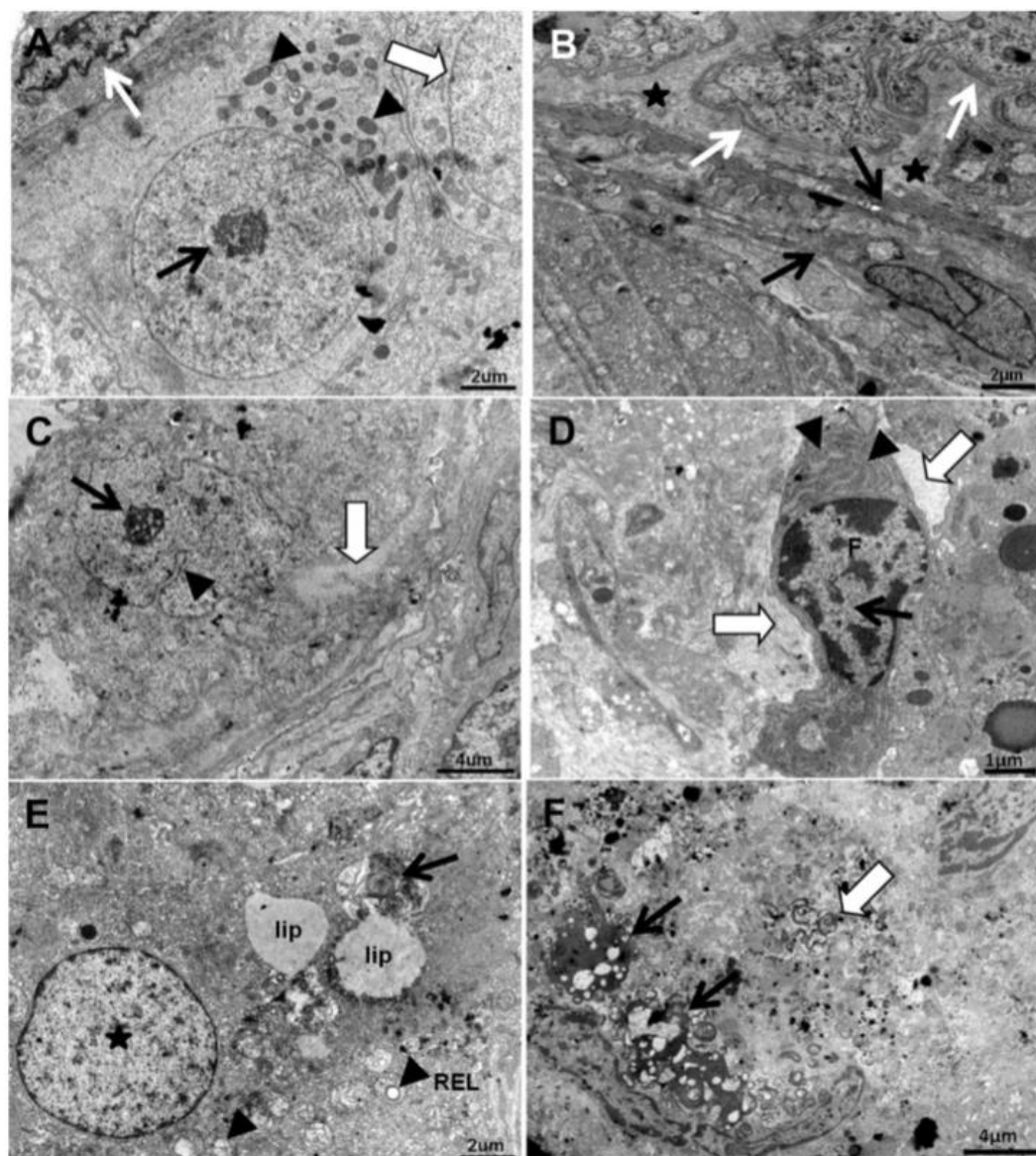


Figura 13 – Microscopia eletrônica de testículos de gatos do grupo controle (A) e grupo tratado (B-F). (A) Célula de Sertoli com nucléolo normal (Seta), células germinativas normais (seta grande), células mióides normais (seta branca) e mitocôndrias normais (ponta de seta). (B) Aumento da espessura da túnica própria (seta branca), deposição de colágeno abaixo da membrana basal (estrela) e extensões das células mióides (setas). (C) célula de Sertoli com um núcleo enrugado (ponta de seta) e nucléolo normal (seta). Deposição de colágeno abaixo da membrana basal (seta grande) e ausência de interação entre as células de Sertoli e células germinativas. (D) Fibroblasto ativo (F) no tecido intertubular. Retículo endoplasmático dilatado (ponta de seta), cromatina afrouxada (seta) e deposição de colágeno (setas grandes). (E) Célula de Leydig com núcleo aumentado e cromatina afrouxada (estrela), mitocôndria vacuolizada e com ausência de cristas (ponta de seta). Gotas de lipídios (lip) associadas e um vacúolo circunscrito por múltiplos arranjos laminares (figura de mielina; seta) (F) alterações morfológicas em célula de Leydig associadas a necrose. Núcleo denso em estado inicial de cariólise (seta), ausência de mitocôndria, diversas figuras de mielina (seta grande) e perda dos limites entre outras células. (Fagundes et al, 2014)

Fibroblastos com retículos endoplasmáticos dilatados são encontrados, caracterizando síntese acelerada de proteínas. Presumidamente, essa é a razão do grande depósito de colágeno entre os túbulos. (Fagundes et al, 2014)

Há divergências sobre os efeitos da injeção de gluconato de zinco nas concentrações plasmáticas de testosterona em gatos. Oliveira et al (2013) diz que as concentrações de testosterona não foram muito diferentes entre os grupos controle e os grupos tratados, permanecendo dentro dos padrões considerados normais para gatos domésticos, estabelecidos por Kirkpatrick (1985), apontando também, uma tendência da testosterona de diminuir entre os dias 60 e 120 em ambos os grupos, atribuindo esse efeito ao fim da estação de acasalamento (Tsutsui et al, 2009). Fagundes et al (2014) não encontrou diferenças significativas no dia 60 pós injeção, mas, mesmo com a variação causada pela estação de acasalamento, a testosterona do grupo tratado sofreu uma grande queda (94,1%) 120 dias após a injeção (Tabela 1).

**Tabela 1 - Concentração de testosterona plasmática (Pg/mL) em animais controle (solução salina) e animais tratados (gluconato de zinco) 0, 60 e 120 dias após a administração. (Média  $\pm$  desvio padrão) (Adaptado de Fagundes et al, 2014)**

Grupo	Dia 0	60 Dias	120 Dias	P
Controle (n = 6)	88.85 $\pm$ 136.45	100.63 $\pm$ 146.36	101.46 $\pm$ 144.94	0.812
Tratado (n = 6)	102.82 $\pm$ 143.88 <sup>a</sup>	144.06 $\pm$ 143.83 <sup>a</sup>	5.94 $\pm$ 2.22 <sup>b</sup>	0.031 <sup>*</sup>

Apesar das divergências nos resultados, após 120 dias, os animais do grupo tratado sofriam uma redução ou desaparecimento total dos espículos penianos e, diferente do estudo em cães (Oliveira, 2007), os gatos apresentaram uma diminuição de comportamentos indesejados (Oliveira et al, 2013).

O zinco faz parte da composição do plasma seminal e dos tecidos do trato reprodutor masculinos. O zinco também está altamente envolvido na tradução, no transporte e na replicação do DNA (Blanc et al, 1991), estimulando a atividade das enzimas envolvidas no processo de mitose, como DNA polimerase, timidinaquinase, terminaltransferase e ornitina descarboxilase (Oliveira, 2011). Por isso, é um metal importante no sistema imunológico, pois suas células têm altas taxas de proliferação. Além disso, o zinco pode afetar o processo de fagocitose de macrófagos e neutrófilos e interferir no efeito das células *natural killer* (Blanc et al, 1993).

Quando em altas concentrações, o Zinco inibe a divisão e replicação de células germinativas, ao mesmo tempo em que causa quebras da membrana celular e núcleo (Fahim et al, 1993). A exposição a concentrações elevadas de zinco no organismo levam ao aumento dos leucócitos, estimulada pela presença do mineral. Acredita-se que ao administrar a solução a base de zinco nos testículos, ocorrem alterações semelhantes à orquite autoimune, em que ocorre um processo inflamatório por formação de anticorpos contra os antígenos testiculares. (Mann e Lutwak-Mann, 1981). O zinco também inibe a atividade da 5-alfaredutase em concentrações maiores do que  $10^{-4}$  M, enquanto concentrações menores estimulavam a conversão de testosterona em Di-hidrotestosterona. (Oliveira, 2007, Fahim et al, 1993).

Em gatos, possivelmente, o Gluconato de Zinco é mais agressivo do que em cães, visto que, enquanto nos cães, as lesões se encontram mais concentradas no local da injeção (Oliveira, 2007), nos gatos, as lesões ocorreram mais uniformemente (Oliveira et al, 2013). Vale ressaltar que a dose utilizada nos gatos foi maior do que em cães. Em cães, muitos tutores preferem manter o comportamento (a guarda da casa) enquanto promovem a esterilização. Em alguns animais, como os gatos, esse não é o caso e um método eficaz seria aquele que suprime a androgênese e a libido (Jana & Samantha, 2011). Como o experimento em cães na dose de 0,3mL de Gluconato de Zinco para um testículo de 12-14mm de largura (Oliveira et al, 2007) não surtiu efeito na libido, a dose com gatos foi aumentada para 0,44-0,51 mL em cada testículo. Os melhores efeitos na libido e a atrofia testicular foram atribuídos a esse aumento na dose (Oliveira et al, 2013)

O ciclo da espermatogênese no gato é de 46,8 dias (França e Godinho), então a azoospermia se manteve por dois ciclos mostrando o efeito prolongado do gluconato de zinco (oliveira, 2013)

Kar & Das (1962) fizeram um estudo com cloreto de zinco, na dose de 50-200µg/kg em coelhos, e não houve nenhuma alteração. Talvez esse paradoxo possa ser explicado devido à menor dose comparado aos estudos de Wang, (2002) ou, possivelmente pelo mesmo mecanismo que torna o coelho resistente ao cádmio (E. Cameron, 1965). É importante ressaltar que o zinco e o cádmio são fortemente relacionados, ambos pertencendo ao mesmo grupo da tabela periódica e tendo

características similares ao ponto do cádmio ser assimilado no lugar do zinco, causando anormalidades na conformação e ativação de proteínas e enzimas. (Martelli, 2006, Hamer, 1986). Além disso, para que ocorra toxicidade pelo zinco, é preciso que a concentração exceda a capacidade de captação da metalotioneína e da glutathione peroxidase, que são enzimas cujo principal propósito é a captação de agentes oxidantes, evitando que esses intoxiquem o organismo (Martelli, 2006). Devido a esse complexo mecanismo enzimático, é plausível crer que diferentes animais têm diferentes tolerâncias aos agentes esclerosantes como Cádmio e Zinco.

Um estudo feito com ursos (*Ursus americanus*) com Gluconato de zinco na dose de 13,1 mg/mL buscava testar a capacidade do gluconato de zinco ser usado para controlar as populações de ursos nos EUA. Todos os ursos se recuperaram sem efeitos adversos nos testículos e poucas alterações histológicas. Essas alterações se assemelhavam às alterações encontradas em cães sujeitos ao tratamento a base de gluconato de zinco, indicando que sua origem deve ser a mesma. Mudar a dose ou usar um veículo como DMSO para facilitar a penetração talvez possa ser uma solução (Brito et al, 2011).

Há controvérsias sobre a melhor via de administração. A injeção intraepididimal pode ser considerada mais segura por não afetar a barreira hematotesticular, evitando assim, causar uma reação inflamatória sistêmica devido aos autoantígenos testiculares (Johnston, 2001). Porém, a injeção intraepididimal não causa alterações hormonais e comportamentais, o que não é desejado em alguns animais (Jana & Samantha, 2011). Além disso, quando se trata do zinco, acredita-se que a resposta imunomediada exacerbada seja um dos mecanismos de ação que tornam o zinco tão eficiente como agente esclerosante (Blanc et al, 2011), o que o torna menos eficiente por via intraepididimal.



### 3.3.3 Cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>)

O Cloreto de cálcio pode ser usado em uma base aquosa ou alcoólica e tem sido usado em uma variedade de animais incluindo bezerros (Koger, 1978), touros (Mitra e Samanta, 2000), cães (Jana e Samanta, 2007, Leoci et al., 2014a), gatos (Jana e Samanta, 2011), ratos (Jana e Samanta, 2006), Muares (Ibrahim et al., 2016) e bodes (Jana et al., 2005).

Quando Parízek descreveu os efeitos do cádmio em testículos de ratos (1953,1956), abriu as portas para diversas novas pesquisas envolvendo elementos metálicos raros e sais encontrados na terra, e se esses tinham os mesmos efeitos nos testículos de mamíferos. Foi realizado um estudo utilizando 42 compostos buscando a descoberta de elementos que surtiriam os mesmos efeitos do cádmio por administração subcutânea (Kamboj & Kar, 1963). Dentre esses compostos, estava o Cloreto de Cálcio.

Ironicamente, o CaCl<sub>2</sub> foi classificado como um dos poucos agentes a não causar redução significativa de peso testicular e cuja aparência do testículo após o experimento permanecia macroscopicamente e histologicamente normal. Por isso, nesse estudo, foi descartado como um possível agente indutor de infertilidade.

Após alguns anos, foi apontado que o CaCl<sub>2</sub>, usado para tratar hipocalcemia e paradas cardíacas, levava à gangrena seca quando injetado perivascularmente (Jenkins & Clark, 1977). Esse efeito adverso poderia ter alguma utilidade no tratamento de neoplasias e hiperplasias ou em procedimentos como mochação e, finalmente, castração (Koger, 1977). Apesar de testes promissores em gatos, cães, porcos, bodes e carneiros, o foco do estudo era a esterilização de bezerros. A solução aquosa na concentração de 50% foi considerada ideal por ser de fácil preparo, ainda mantendo efetividade, e foi usada para os primeiros testes. Mais tarde, durante os testes de mochação, foi estabelecido que uma solução alcoólica era mais eficiente, mesmo sendo restrita a concentrações menores de CaCl<sub>2</sub>. Era imprescindível que a solução não extravasasse, sob risco de levar à necrose escrotal. A dose variava de acordo com o tamanho do testículo, estando entre 1 e 1,5mL a cada 45kg de peso vivo. Ocorria Inflamação testicular na primeira semana, que regredia em 3-6 dias, sendo substituída por endurecimento e atrofia testicular. Animais velhos o suficiente para apresentar características sexuais

secundárias apresentaram mudanças comportamentais dentro de duas semanas (Koger, 1977).

Após um ano, a técnica já havia sido utilizada em mais de 300 bovinos e haviam casos bem sucedidos em cães (Koger, 1978). A melhor técnica para administração intratesticular, assim com a concentração ideal, no entanto, ainda não estavam completamente estabelecidas. Ocorria supressão no volume de ejaculado, motilidade, tamanho testicular e concentrações de testosterona quando cães eram tratados com uma solução de 10, 20, 30 ou 60% de  $\text{CaCl}_2$  em solução salina de  $\text{CaCl}_2$  (Leoci et al., 2014a). Foram encontrados sinais de azoospermia em 60%, 80%, 100% e 100% dos animais tratados respectivamente com soluções 10%, 20%, 30% e 60% de  $\text{CaCl}_2$ . Mais efeitos colaterais foram observados em cachorros tratados com as soluções de 30% e 60% no qual 20% dos cães tratados com uma solução de 30% e 60% dos cães tratados com uma solução 60% desenvolveram úlceras escrotais, fistulas e necrose testicular, sendo necessária orquiectomia cirúrgica. Nenhum efeito colateral foi notado em doses menores. A conclusão foi de que o tratamento com doses menores induz citotoxicidade das células necessárias para espermatogênese sem causar necrose extensa do tecido. Em outro estudo, foi administrada 20% de  $\text{CaCl}_2$  em cães machos em solução a 1% de lidocaína, ou em uma solução de etanol 95% ou solução salina para controle, sendo os volumes injetados adequados ao volume testicular (Leoci et al., 2014b). Doze meses após o tratamento, respectivamente, 100% e 81% dos cachorros tratados com álcool e lidocaína estavam azoospermicos. As concentrações séricas de testosterona estavam mais baixas nos cães tratados com base alcoólica e intermediárias no grupo tratado com lidocaína, quando comparados com o grupo controle. Nenhum efeito colateral nocivo foi notado em nenhum dos tratamentos. Os autores concluíram que a solução de  $\text{CaCl}_2$  dissolvido em álcool era mais eficiente para esterilizar cães machos sem efeitos adversos. Esses resultados indicam que uma solução 20% em uma base alcoólica provavelmente é a ideal em termos de eficácia e a evitar efeitos colaterais como dor e lesões escrotais (Cavalieri, 2017).

Os efeitos são dependentes da dose e da massa testicular (Jana e Samanta, 2007). Estudos sobre a dose ótima para alguns animais foram realizados, sendo a dose mínima para ratos de 5mg e a dose ótima, entre 10 e 20mg (Jana et al.,

2002). Para cães, a dose ótima está entre 15-20mg (Jana & Samanta, 2007) e para bodes, de 10 a 40mg/kg/testículo (Jana et al., 2005).

Efeitos colaterais incluem inchaço escrotal, marcha rígida com sinais desaparecendo em um período de quatro a cinco dias (Koger, 1978), apesar de outros estudos notarem o desaparecimento dos sinais de inchaço em três a quatro semanas após o tratamento (Jana et al., 2005; Jana & Samanta, 2011). A dor na hora do tratamento aparenta ser mínima, pois há poucas terminações nervosas no parênquima testicular (Jana & Samanta, 2007). Entretanto, pode ocorrer dor se o fluido escapar do parênquima testicular para o espaço escrotal ou se ocorrer distensão da túnica albugínea no momento da administração. Também foram observadas úlcera escrotal e necrose testicular em cães (Leociet al., 2014a), muare (Ibrahim et al., 2016) e touros (Canpolat et al., 2006) associadas ao tratamento com  $\text{CaCl}_2$ .

Os achados macroscópicos são controversos. Enquanto Jana e Samanta (2007) encontraram redução de volume testicular em cães, Silva et al. (2018), se baseando nos mesmos métodos descritos por Jana e Samanta (2007), não encontraram nenhuma diferença significativa no volume testicular dos cães tratados. Os cães estudados raramente apresentavam sinais de dor, tendo apenas um leve desconforto imediatamente após a aplicação, provavelmente causado pelo aumento temporário da pressão intratesticular. Um dos cães apresentou uma ulceração, mas após avaliação histológica, foi constatado que isso se devia a presença de uma neoplasia mesenquimal não detectada, que aumentou de tamanho devido à inflamação pós injeção, levando ao aparecimento de um abscesso (Silva et al., 2018).

A avaliação microscópica de Silva et al (2018) demonstra alterações degenerativas bem marcadas no tecido testicular, tanto em túbulos seminíferos como células de Leydig. As porções proximal, medial e distal apresentavam lesões semelhantes sendo mais evidentes na porção medial do testículo. Foi encontrada fibrose severa, associada a infiltrado inflamatório mononuclear em túbulos seminíferos e interstício na maioria dos testículos. Em algumas amostras, foram observadas células gigantes. Necrose maciça era rara em túbulos seminíferos e não havia fibrose na maioria deles. As células germinativas se encontravam

desorganizadas e descamadas, apresentando características de necrose. Algumas vezes, era possível encontrar espermátides multinucleadas no lúmen. Diversos túbulos seminíferos apresentavam somente uma camada de células e células de Sertoli viáveis, outras apresentavam células de Sertoli vacuolizadas. E algumas mostravam ausência ou atrofia de células germinativas. O espaço intertubular se encontrava edemaciado, mas diversas células de Leydig foram encontradas após os 60 dias do estudo, especialmente nas regiões sem edema. Na maioria das amostras, foram encontradas áreas com túbulos seminíferos contendo células germinativas, envoltos por tecido fibroso conectivo. Foram encontrados focos calcificados nos interstícios, na túnica íntima de artérias e no espaço intertubular na maioria das amostras (Figura 14).

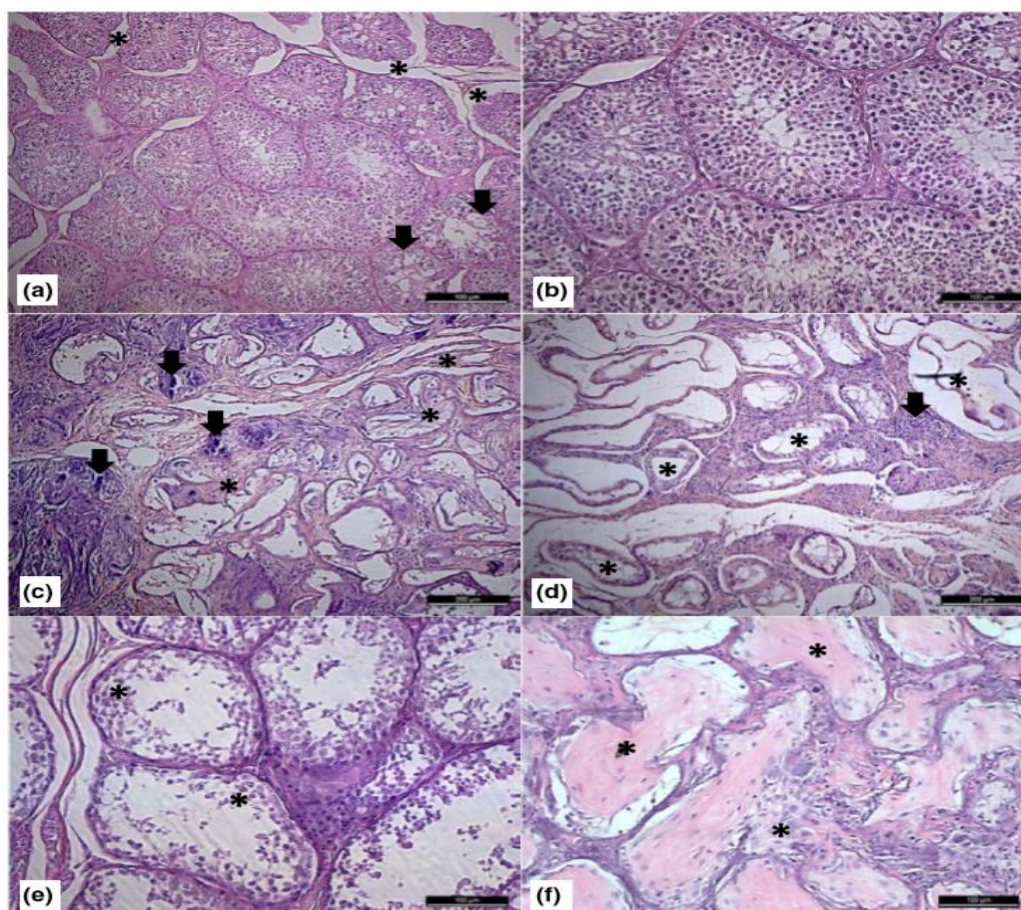


Figura 14 - Microscopia de luz de testículos de cães tratados com injeção intratesticular. (a) Solução salina (Controle) – edema de espaço intertubular (\*) e focos de células esfoliadas ou desorganizadas em túbulo seminífero (seta). (b) Solução salina (grupo controle) – células germinativas normais nos túbulos seminíferos e tecido intersticial inteiro. (c) Injeção com CaCl<sub>2</sub> (grupo tratado) – tecido fibroso em espaço intratubular e intersticial (\*) e depósito de matéria basofílica (calcificação distrófica) em túbulos necrosados (seta). (d) Injeção de CaCl<sub>2</sub> (grupo tratado) – Diversos túbulos seminíferos apresentavam somente as primeiras camadas celulares ou atrofiavam e ausência de células germinativas e espermatozoides em túbulo seminífero (\*) e infiltração focal mononuclear em tecido intersticial (seta). (e) Injeção de CaCl<sub>2</sub> (grupo tratado) – células esfoliadas com características necróticas. Injeção de CaCl<sub>2</sub> (grupo tratado) – fibrose substancial em interstício e túbulos seminíferos (Silva et al., 2018)



Jana e Samanta (2011) realizaram testes em felinos, com o propósito de usar o  $\text{CaCl}_2$  nas concentrações de 5, 10 e 20% como contraceptivo para controlar a população de felinos. Após os 60 dias do estudo, foram observadas alterações macroscópicas significativas nos testículos dos animais tratados, sendo observada diminuição dose-dependente do volume testicular (Figura 15).

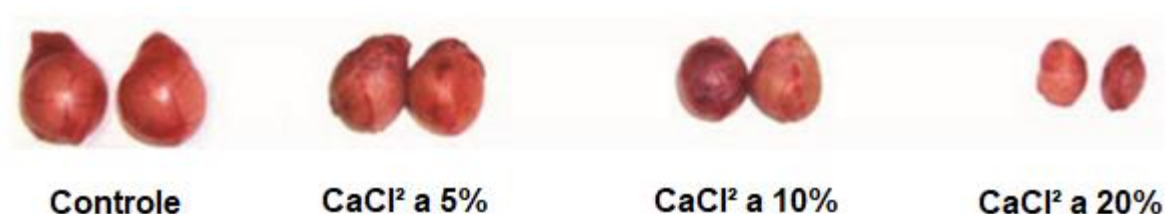


Figura 15 - Fotografia demonstrando a comparação entre o volume testicular após os 60 dias de injeção bi-lateral intratesticular de 0,25ml de solução salina, 5%, 10% ou 20% de solução contendo  $\text{CaCl}_2$  (Adaptado de Jana e Samantha, 2011).

As alterações histológicas também eram variáveis de acordo com a dose testada. Foram observados diversos danos severos em túbulos seminíferos e células de Leydig. A dose de 5% induz dissociação de células germinativas com atrofia de túbulos seminíferos, mostrando a eliminação de todas as células germinativas, com presença apenas de espermatogônias e células de Sertoli. O dano nessa dose é mal distribuído e os túbulos são afetados de forma inconsistente (Figura 16).

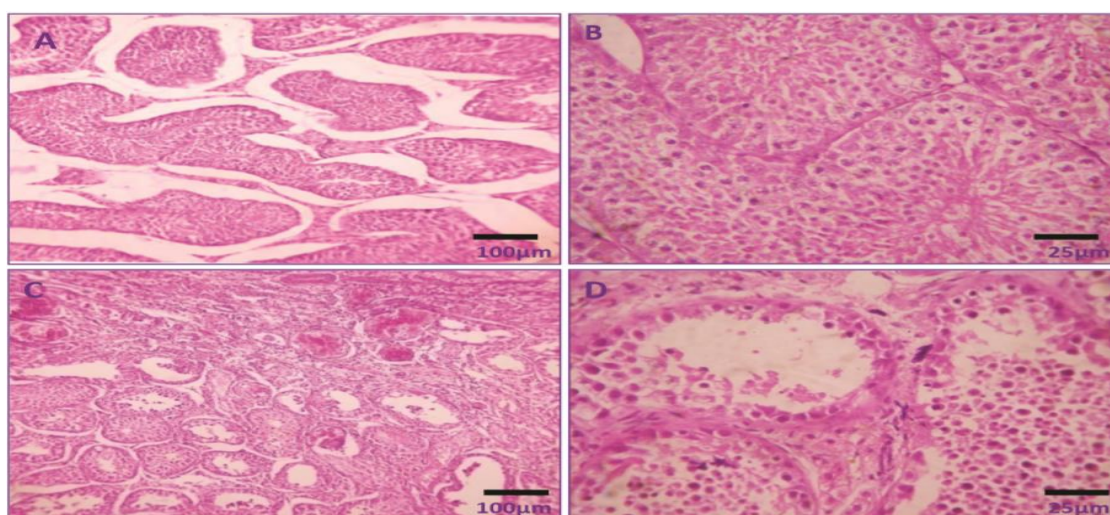


Figura 16 - Micrografia demonstrando histologia testicular de um felino 60 dias após injeção intratesticular de 0,25ml de solução salina contendo 1% de cloridrato de lidocaína mostrava arranjo normal das células germinativas nos túbulos seminíferos com espaço intersticial distinto (A & B). Solução de cloreto de cálcio a 5% contendo 1% de cloridrato de lidocaína induzia desarranjo de células germinativas nos túbulos seminíferos ao ponto de algumas se destacarem e serem levadas ao longo do túbulo (C & D) (Jana & Samanta, 2011)

Na dose de 10%, é possível ver necrose de epitélio seminífero e espaço intersticial, assim como células germinativas degeneradas e tecido fibroso no espaço tubular. A injeção com 20% de  $\text{CaCl}_2$  resulta em completa necrose testicular de todo o epitélio germinativo com presença exclusiva de tecido fibroso e hialino, ocorrendo total desorganização da arquitetura tubular e compartimentos extratubulares. Não havia indícios de células germinativas maduras ou imaturas, nem sinais de regeneração, sendo das células de Leydig ou células da linhagem germinativa. (Figura 17)

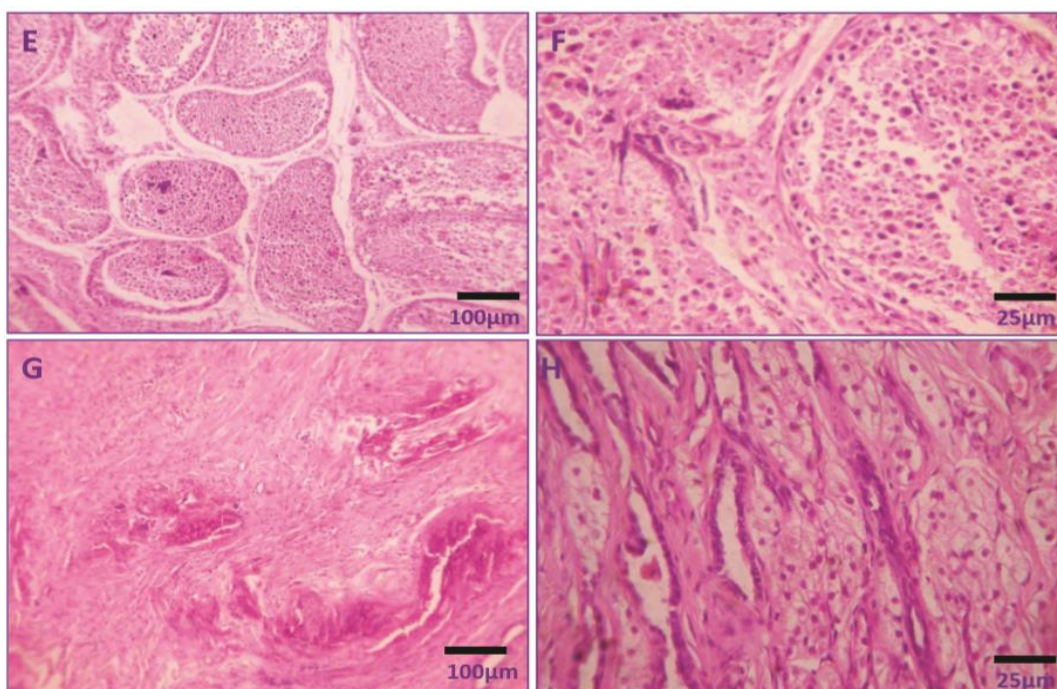


Figura 17 - Micrografia mostrando histologia de testículo de felino 60 dias após injeção intratesticular com solução de 0,25ml de  $\text{CaCl}_2$  a 10% contendo cloridrato de lidocaína a 1%, demonstra necrose coagulativa em epitélio seminífero e espaços intersticiais, assim como a presença de células germinativas degeneradas, tecido fibroso e infiltrado inflamatório de leucócitos no espaço tubular e intersticial (E & F) ou injeção com a solução de  $\text{CaCl}_2$  a 20%, contendo cloridrato de lidocaína a 1% resultando em necrose testicular completa com presença apenas de tecido fibroso e hialino, sem sinais de células germinativas ou células de Leydig (G & H) (Jana & Samanta, 2011)

Os efeitos da concentração de LH e FSH foram estudados em ratos (Figura 18) (Jana et al., 2002), em bodes (Jana et al., 2005) e em cães (Jana & Samanta, 2007). Em todos os estudos, as concentrações aumentam gradativamente, quanto maior a dose administrada, provando novamente o efeito dose-dependente do cloreto de cálcio. Esse aumento nas concentrações é perfeitamente lógico, pois a degeneração das células de Leydig e Células de Sertoli cessariam a produção dos diversos fatores inibidores da secreção de hormônios progestágenos como a inibina

e a própria testosterona, acarretando em um aumento descontrolado dos LH e FSH. (Plant, 1982)

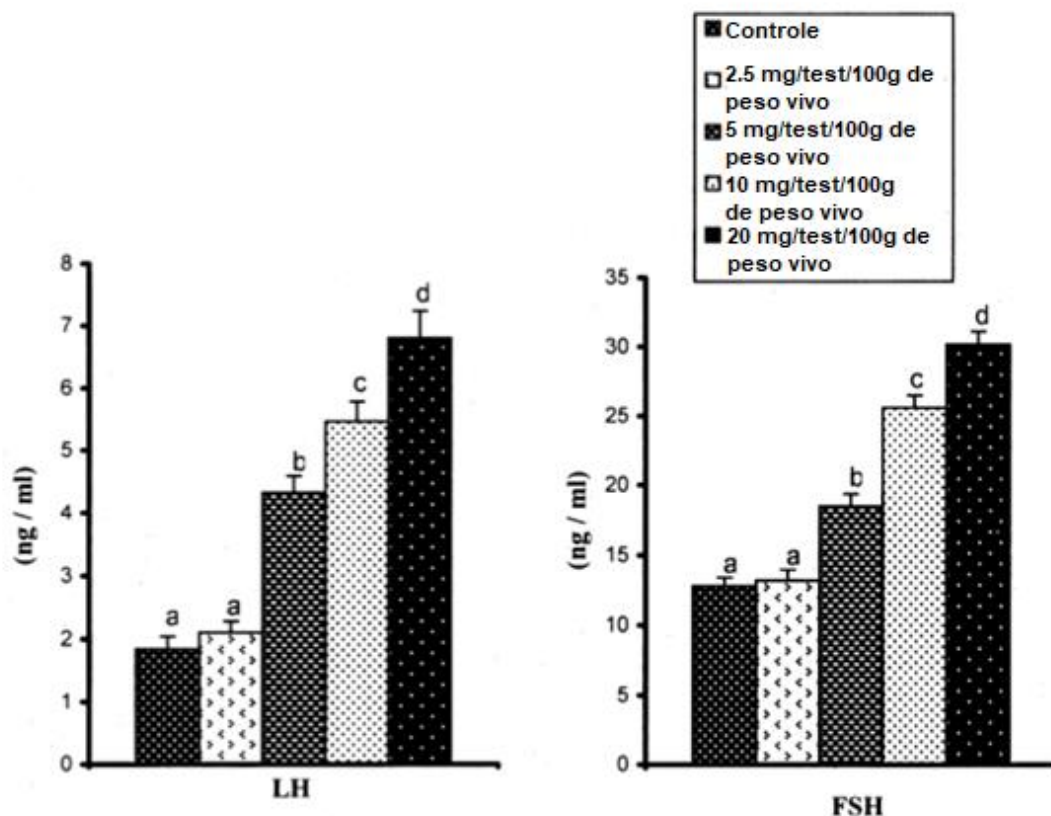


Figura 18- Representação gráfica do efeito de injeção intratesticular de cloreto de cálcio na concentração plasmática de LH e FSH em ratos albinos. Figuras com letras diferentes (a,b,c,d) indicam a probabilidade deles serem estatisticamente distintos (b,c  $p<0.05$ , d  $p<0.001$ , de acordo com o controle) (Adaptado de Jana et al., 2002)

Em todos os estudos realizados por Jana et al. (2002, 2005), assim como nos estudos realizados por Jana & Samanta (2007, 2011), a concentração de testosterona sérica caía de acordo com a dose utilizada. Essa queda seria causada pela destruição das células de Leydig, sem as quais, não há secreção de testosterona. Silva et al (2018) encontraram diminuição no nível da testosterona, mas diferente dos outros estudos, os números encontrados não tinham significado estatístico para comprovar a diminuição da testosterona durante os 60 dias do estudo (Figura 19).

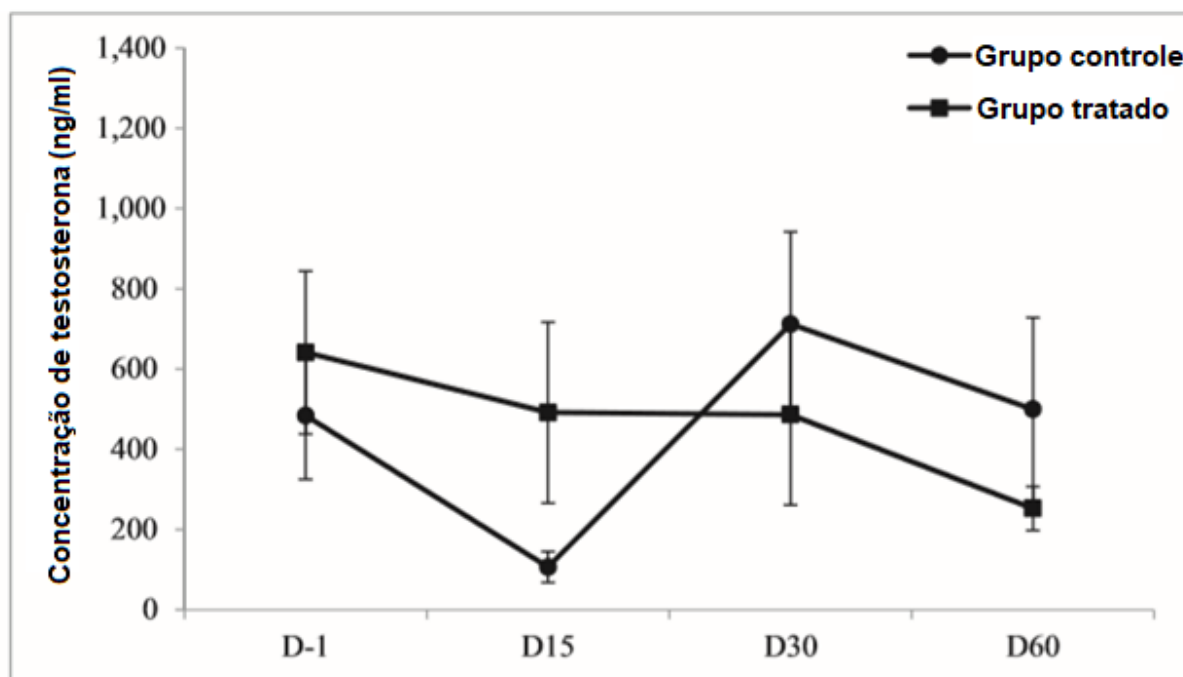


Figura 19 - Média  $\pm$  erro padrão da concentração sérica de testosterona em cães 60 dias após injeção de cloreto de cálcio por via intratesticular. (Silva et al, 2018)

Além disso, ocorre resposta inibitória pela administração do  $\text{CaCl}_2$ , reduzindo a atividade das enzimas  $17\beta$ -Hidroxiesteróide desidrogenase ( $17\text{-HSD}$ ) e  $3\beta$ -Hidroxiesteróide desidrogenase ( $3\beta\text{-HSD}$ ). O nível de inibição cresce conforme aumenta a dose (Figura 20) (Jana et al., 2002, 2005, Jana & Samanta, 2007, 2011). Essas duas enzimas são chave para a androgênese testicular (Berne & Levy, 2009) e sua atividade diminuída explica a menor concentração da testosterona circulante. Outras enzimas testiculares inibidas são a Superoxido dismutase (SOD) e a glutathione S-transferase (GST) (Figura 21), duas enzimas importantes na captação de radicais livres no testículo (Samanta et al., 1999). Essa baixa atividade pode estar relacionada ao baixo nível de testosterona (Hatayama et al., 1986).



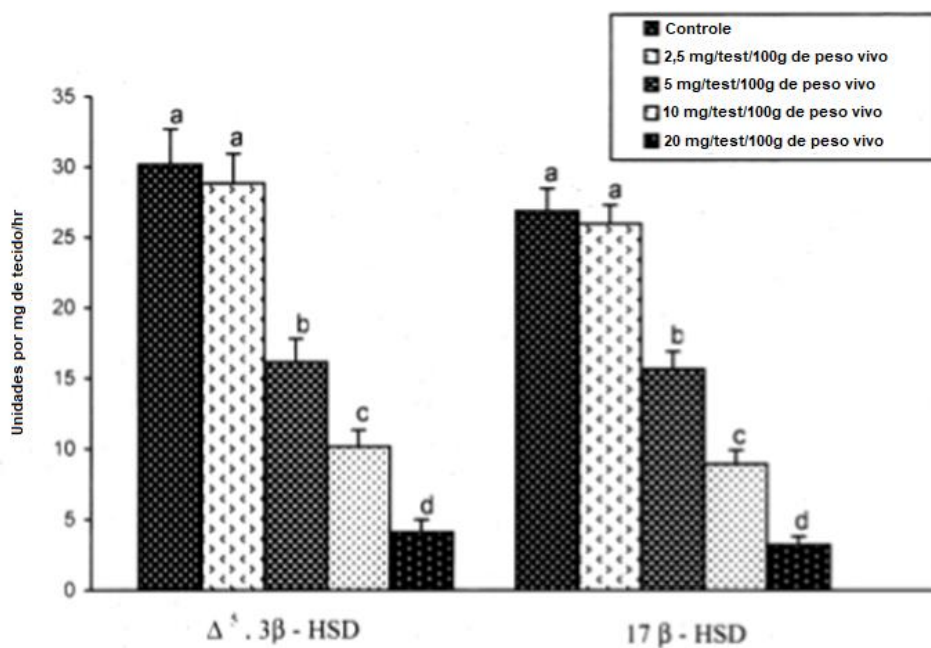


Figura 20 - representação gráfica do efeito de uma única administração intratesticular de Cloreto de Cálcio em ratos albinos na atividade das enzimas 3 $\beta$ -Hidroxiesteróide desidrogenase (3 $\beta$ -HSD) e 17 $\beta$ -Hidroxiesteróide desidrogenase (17 $\beta$ -HSD). As diferentes letras representam diferentes significâncias estatísticas (b,c p<0,01, d p<0,001)(Adaptado de Jana et al., 2002)

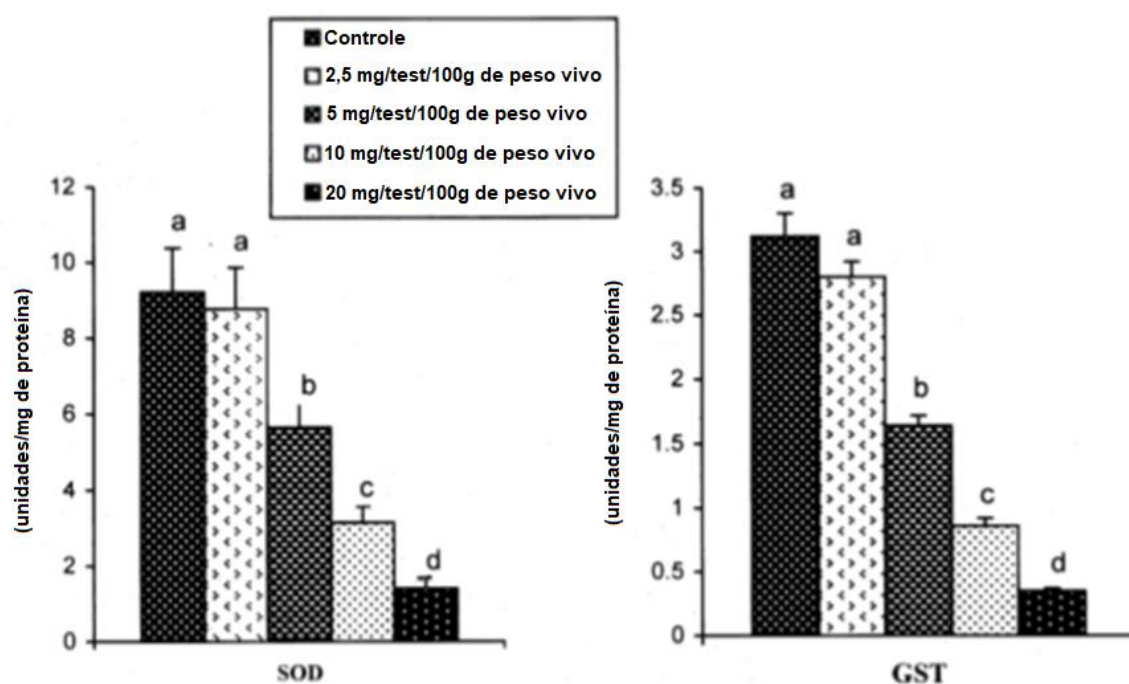


Figura 21- Representação gráfica do efeito de uma única dose intratesticular de CaCl<sub>2</sub> em ratos albinos na atividade enzimática de SOD e GST. Figuras com diferentes letras indicam significância estatística diferente (b,c p< 0,01, d p<0,001 relativo ao controle)(Adaptado de Jana et al., 2002)

Os níveis séricos de Malondialdeído (MDA), um produto formado pela peroxidação lipídica (Ohkawa et al, 1979) no testículo, se elevam consideravelmente conforme a dose aumenta (Jana et al., 2002, 2005, Jana & Samanta, 2007), indicando um aumento na produção de radicais livres (Jana, Samanta & Gosh, 2002). Além disso, a infiltração de leucócitos também aumenta a liberação de radicais livres (Sikka, 2001) e a menor atividade de SOD e GST significam menor captação dos radicais livres já presentes (Jana, Samanta & Gosh, 2002).

Acredita-se que o principal mecanismo do  $\text{CaCl}_2$  é sua alta propensão à criação de radicais livres em qualquer tecido (Kakkar et al., 1992), capazes de destruir qualquer tipo de célula (Halliwell, 2015). Isso leva à uma reação em cadeia (Figura 22), destruindo os tecidos tubulares e intersticiais, levando a uma diminuição da concentração sérica da testosterona, inibindo a atividade de enzimas antioxidantes. (Jana et al., 2002, 2005; Jana & Samanta, 2007, 2011).

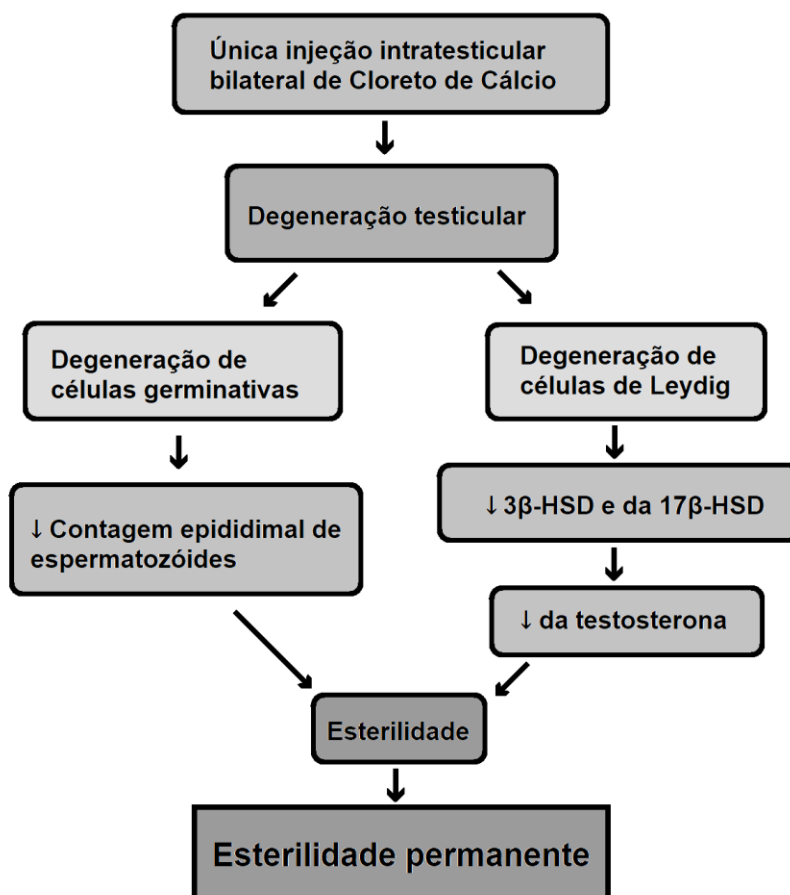


Figura22 - Diagrama do mecanismo relacionado à indução de infertilidade em gatos machos após única dose intratesticular de  $\text{CaCl}_2$  (Adaptado de Jana & Samantha, 2011)

Devido ao fator dose-dependente do cloreto de cálcio, ele permaneceu invisível como promotor de infertilidade nos primeiros estudos de Kamboj & Kar (1963). Esse estudo buscava por elementos naturais esclerosantes em doses baixas e o  $\text{CaCl}_2$  necessitava de uma dose intratesticular maior do que a testada.

No estudo de Silva et al (2018), foi usado DMSO como veículo. Apesar de sua grande capacidade como carreador e potencializador, também tem ação antioxidante e antiinflamatória (Alves, 1998), o que pode interferir no mecanismo de ação do  $\text{CaCl}_2$ . Os resultados do estudo de Silva et al (2018) diferiram dos outros autores que alegam ter alcançado a degeneração total do tecido testicular. Silva et al (2018) classificou os testículos estudados de acordo com o grau de degeneração, obtendo resultados menos promissores em relação a outros autores, sem alcançar a azoospermia de todos os animais aos 60 dias. Porém, nos cães que se tornaram azoospermicos, os resultados puderam ser observados aos 30 dias do experimento, sendo mais rápidos do que o zinco injetado por via intraepididimal (Fahim et al., 1993). Lembrando dos efeitos dose-dependentes do  $\text{CaCl}_2$  (Jana et al., 2005), é válido ressaltar que a concentração de  $\text{CaCl}_2$  usada no estudo de Silva (7,5%) é menor do que a utilizada em soluções alcoólicas (20%)(Koger, 1977), e menor do que outro estudo, realizado em gatos, utilizando a concentração de 20% de  $\text{CaCl}_2$  com DMSO a 0,5% (Paranzini et al., 2018). Esse estudo anterior encontrou redução ou ausência dos espículos penianos nos gatos após 80 dias, sinalizando uma queda da testosterona a níveis não compatíveis com as necessidades hormonais em machos, além de constatar diminuição de 50% do volume testicular ao final do experimento. Isso indica que, possivelmente, um aumento na concentração de  $\text{CaCl}_2$  seja necessário, mesmo utilizando DMSO 0,5% como veículo. Nos estudos de Silva (2018), é pouco provável que a testosterona fosse abaixar mais, mesmo ao se aumentar o tempo do experimento. Nos animais de Paranzini (2018), foi encontrada hiperplasia de células de Leydig em sete dos 12 animais. Desses 7, cinco não apresentavam nenhuma outra alteração intersticial. Essa hiperplasia é uma tentativa das células de Leydig de retomar a concentração de testosterona (Vannucchi, 2015), mas é importante lembrar que altas concentrações de hormônios gonadotróficos *in vivo* levam as células a secretar androstenediona em vez de testosterona (Hall & Eik-Nes, 1963) e que em todos os estudos anteriores com  $\text{CaCl}_2$ , as concentrações de  $3\beta$ -HSD e  $17\beta$ -HSD se encontravam diminuídas,

impossibilitando a transformação da pregnenolona em androstenodiona e depois em testosterona (Berne & Levy, 2009).

O Cloreto de Cálcio é um substrato de fácil obtenção e preço acessível. Não causa dor crônica e a técnica é relativamente simples. Já foi usado em diversos animais (Koger, 1978; Jana e Samanta, 2006, 2007, 2011; Ibrahim et al., 2016), porém, seu uso como agente castrativo para controle populacional ainda precisa de mais estudos.

### **3.3.4 Discussão castração química**

Existem diversos agentes esclerosantes menos estudados como, por exemplo, o Cloreto de ferro e sulfato ferroso (Kar et al., 1965); metais pesados com mecanismos semelhantes ao cádmio, Glicerol (Wiebe et al., 1989); que causa pouca ou nenhuma alteração na dosagem hormonal e Ácido láctico (Fordyce et al., 1989); um método doloroso, que levava à necrose escrotal em 25% dos casos, e que foi comprovado ineficaz em cães (Immegart et al., 2000). Esses agentes causam destruição seletiva do parênquima testicular com danos reversíveis do tecido intersticial e células de Leydig, levando a comportamentos indesejados e causando problemas de manejo. Além disso, esses agentes causam dor, febre e muitas vezes, levam à orquite severa (Jana et al., 2005). A formalina 10% foi injetada em 10 ovinos, permitindo a detecção de perda de massa testicular e dano nos túbulos seminíferos (Ijaz et al, 2000). Um agente interessante que tem sido testado é a solução salina hipertônica (Emir et al., 2008). Não foram encontrados efeitos adversos no escroto, mas foi relatada necrose em toda a área dos testículos, porém, sem resultados estatisticamente confiáveis nos níveis de testosterona. Ainda é necessário realizar muitos estudos com esse agente para descobrir sua real importância.

Apesar de o cádmio ser um agente perigoso e imprevisível, sendo até chamado de veneno em alguns artigos (Martelli, 2006; E. Cameron & Foster, 1973), merece lugar de destaque na pesquisa em busca de um agente castrativo ideal. A descoberta incidental de seus efeitos testiculares por Parízek (1963) abriu as portas para diversos estudos em busca de elementos com propriedades parecidas, afim de desenvolver uma técnica mais fácil, mais barata e com menos efeitos colaterais do

que a orquiectomia, sendo uma das principais finalidades o controle populacional de animais de rua (Jana & Samanta, 2007, 2011). Não é por acaso que os efeitos do zinco começaram a ser estudados, pois cádmio e zinco pertencem ao mesmo grupo na tabela periódica, tendo propriedades semelhantes, ao ponto do zinco competir com o cádmio pelos mesmos sítios de ligação, podendo até, momentaneamente, prevenir os efeitos tóxicos da injeção intratesticular com cádmio (Parízek, 1957). Era pertinente estudar os efeitos do zinco, pois, diferente do cádmio, o zinco não é carcinogênico e está presente em abundância no organismo, principalmente no sistema reprodutor (Hidiroglou, 1984) sendo necessárias doses relativamente altas para se obter toxicidade (Fahim et al. 1993). O zinco é considerado um agente esterilizador de sucesso, existindo inclusive, produtos comerciais à base de Gluconato de zinco a venda no mercado (Oliveira et al. 2011). A maioria dos estudos realizados com o Gluconato de zinco (Oliveira & Silva, 2007; Vanderstichel., 2015) testa a eficácia desses produtos comerciais.

O cloreto de cálcio foi ignorado pelos pesquisadores que buscavam elementos naturais com as mesmas características do cádmio (Kamboj & Kar, 1963) devido à baixa dose utilizada no experimento. Diferente do zinco, que precisa ultrapassar um patamar, exaurindo a capacidade de captação das metaloenzimas, para ter um efeito tóxico (Oliveira, 2007, Fahim et al., 1993), a toxicidade do Cloreto de Cálcio ocorre de forma dose-dependente (Jana et al., 2002, 2005; Jana & Samanta, 2007, 2011), sendo seus efeitos mais extensos conforme a dose aumenta.

Os efeitos contraceptivos de alguns desses compostos podem ser considerados seguros, de baixo custo e de fácil aplicação. Ainda assim, há resistência por parte da população de utilizar a castração química. De acordo com Fahim (1993): (a) não havia interesse por parte da indústria farmacêutica em realizar pesquisas na área, pois os possíveis efeitos colaterais poderiam levar a diversos processos judiciais, (b) o governo não disponibilizava dinheiro para os estudos na área, (c) pressão popular levava os pesquisadores da área a buscarem tratamentos para a infertilidade em vez de métodos para promover infertilidade e (d) a maioria dos agentes esclerosantes da época causavam irritação ou ulceração escrotal e nem sempre levavam à azoospermia. Até hoje, apesar das novas técnicas serem mais eficientes e mais seguras, ainda não são 100% eficazes.

#### 4. Conclusão

Os métodos contraceptivos não-cirúrgicos não são novos. Apesar de alguns métodos estarem bem estabelecidos há anos, nenhum método contraceptivo existente é perfeito. A terapia hormonal, devido a sua característica temporária, é ideal para proprietários que queiram controlar os comportamentos de seus machos, mesmo que desejem a reprodução mais tarde. Devido a seus efeitos colaterais, o uso de progestágenos em machos é contra-indicado, enquanto o uso de andrógenos deve ser feito com cautela. Os análogos de GnRH não possuem efeitos colaterais conhecidos e são vendidos comercialmente. A imun contracepção não possui efeitos colaterais conhecidos, mas também não é ideal para controle populacional, devido à imprevisibilidade da duração de seus efeitos. Já o problema da castração química é a necessidade de que ela seja 100% efetiva na destruição de todo o tecido, ou haverá regeneração de células de Leydig ou até de túbulos seminíferos.

A castração química é a mais promissora para o controle populacional de animais errantes, pois a destruição completa, sem regeneração, significa um efeito irreversível de forma barata, não invasiva e com rápida recuperação do animal.

## 5. Referências bibliográficas

- ALSBERG, C. L.; SCHWARTZE, E. W. Pharmacological action of cadmium. **J PharmacolExpTher**, v. 13, p. 504-505, 1919.
- ALVES, Geraldo Eleno Silveira. Dimetilsulfóxido (DMSO). **Saúde Equina**, n. 6, p. 6-10, 1998.
- APGAR, J. Zinc and reproduction. **Annual Review of Nutrition**, v. 5, n. 1, p. 43-68, 1985.
- APGAR, Jean. Zinc and reproduction: an update. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 3, n. 6, p. 266-278, 1992.
- ASA, Cheryl S.; PORTON, Ingrid J. (Ed.). **Wildlife contraception: issues, methods, and applications**. JHU Press, 2005.
- BERNE, R. M.; LEVY, MN; KOEPPEN, BM; STATION, BA Fisiologia 6 ed. Rio de janeiro: Editora Elsevier. **Cap**, v. 15, p. 289, 2009.
- BERRYMAN, Alan A. Mathematical description of the sterile male principle. **The Canadian Entomologist**, v. 99, n. 8, p. 858-865, 1967.
- BOWEN, R. A. Male contraceptive technology for nonhuman male mammals. **Animal reproduction science**, v. 105, n. 1-2, p. 139-143, 2008.
- BRITO, Leonardo FC et al. Effects of intratesticular zinc gluconate treatment on testicular dimensions, echodensity, histology, sperm production, and testosterone secretion in American black bears (*Ursus americanus*). **Theriogenology**, v. 75, n. 8, p. 1444-1452, 2011.
- CAMERON, E. The effects of intratesticular injections of cadmium chloride in the rabbit. **Journal of anatomy**, v. 99, n. Pt 4, p. 907, 1965.
- CAMERON, E.; FOSTER, C. L. Observations on the histological effects of sub-lethal doses of cadmium chloride in the rabbit: I. The effect on the testis. **Journal of anatomy**, v. 97, n. Pt 2, p. 269, 1963.
- CANPOLAT, I. et al. An evaluation of the outcome of bull castration by intra-testicular injection of ethanol and calcium chloride. **Revue de médecinevétérinaire**, v. 157, n. 8/9, p. 420, 2006.

CAVALIERI, John. Chemical sterilisation of animals: A review of the use of zinc-and CaCl<sub>2</sub> based solutions in male and female animals and factors likely to improve responses to treatment. **Animal reproduction science**, v. 181, p. 1-8, 2017.

COHEN, R. D. H. et al. Efficacy and stress of chemical versus surgical castration of cattle. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 70, n. 4, p. 1063-1072, 1990.

CRABO, B. O. Studies on the composition of epididymal content in bulls and boars. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 22, p. SUPPL 5: 1-94, 1965.

DA COSTA, N. A. et al. Ponderal performance of buffaloes chemically castrated, in Belém, Pará State, Brazil. In: **Embrapa Amazônia Oriental-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: BUFFALO SYMPOSIUM OF AMERICAS, 1., 2002, Belém, PA. Proceedings... Belém, PA: APCB: FCAP, 2002., 2002.

DIXIT, V. P. Chemical sterilization: effects of danazol administration on the testes and epididymides of male rabbit. **Acta biologica et medica Germanica**, v. 36, n. 1, p. 73-78, 1977.

DOWSETT, K. F. et al. A preliminary study of immunological castration in colts. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v. 44, p. 183-190, 1991.

DUKES, H. H.; REECE, W. O. Fisiologia dos animais domésticos. Rio de Janeiro (RJ). 2006.

EMIR, Levent et al. Chemical castration with intratesticular injection of 20% hypertonic saline: a minimally invasive method. In: **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**. Elsevier, 2008. p. 392-396.

ENGLAND, G. C. Effect of progestogens and androgens upon spermatogenesis and steroidogenesis in dogs. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v. 51, p. 123-138, 1997.

FAGUNDES, Ana Katharyne F. et al. Injection of a chemical castration agent, zinc gluconate, into the testes of cats results in the impairment of spermatogenesis: A potentially irreversible contraceptive approach for this species?. **Theriogenology**, v. 81, n. 2, p. 230-236, 2014.



Fahim MS, Wang M, Sutcu MF, Fahim Z, Youngquist RS. Sterilization of dogs with intra-epididymal injection of zinc arginine. *Contraception*, v.47, p.107-22, 1993.

FAVIER, Alain Emile. The role of zinc in reproduction. **Biological trace element research**, v. 32, n. 1-3, p. 363-382, 1992.

FAVIER, Alain Emile. The role of zinc in reproduction. **Biological trace element research**, v. 32, n. 1-3, p. 363-382, 1992.

FAVINO, A.; BAILLIE, A. H.; GRIFFITHS, K. Androgen synthesis by the testes and adrenal glands of rats poisoned with cadmium chloride. **Journal of Endocrinology**, v. 35, n. 2, p. 185-192, 1966.

FORDYCE, G. et al. An evaluation of calf castration by intra-testicular injection of a lactic acid solution. **Australian veterinary journal**, v. 66, n. 9, p. 272-276, 1989.

FOSMIRE, Gary J. Zinc toxicity. **The American journal of clinical nutrition**, v. 51, n. 2, p. 225-227, 1990.

FRANÇA, Luiz R.; GODINHO, Christiane L. Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats (*Feliscatus*). **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 5, p. 1554-1561, 2003.

FRESHMAN, J. L. et al. The effects of methyltestosterone on reproductive function in male greyhounds. **Theriogenology**, v. 33, n. 5, p. 1057-1073, 1990.

GHOSH, Prasanta et al. A novel epididymal quiescence factor inhibits sperm motility by modulating NOS activity and intracellular NO - cGMP pathway. **Journal of cellular physiology**, v. 233, n. 5, p. 4345-4359, 2018.

GILMAN, Al; PHILIPS, F. S. The treatment of acute cadmium intoxication in rabbits with 2, 3-dimercaptopropanol (BAL) and other mercaptans. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 87, n. 4 Suppl, p. 85, 1946.

GONZALEZ, A. et al. Immunological approaches to contraception in dogs. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v. 39, p. 189-198, 1989.

GOODPASTURE, Jessie C.; BERGSTROM, Karen; VICKERY, Brian H. Potentiation of the gonadotoxicity of cytoxan in the dog by adjuvant treatment with a luteinizing hormone-releasing hormone agonist. **Cancer research**, v. 48, n. 8, p. 2174-2178, 1988.

GOYER, Robert A.; LIU, Jie; WAALKES, Michael P. Cadmium and cancer of prostate and testis. **Biometals**, v. 17, n. 5, p. 555-558, 2004.

GRAY JR, L. E. et al. Effects of environmental antiandrogens on reproductive development in experimental animals. **Humanreproductionupdate**, v. 7, n. 3, p. 248-264, 2001.

GUNN, Samuel A.; GOULD, Thelma Clark; ANDERSON, W. A. D. Cadmium-induced interstitial cell tumors in rats and mice and their prevention by zinc. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 31, n. 4, p. 745-759, 1963.

HAFEZ, ElsayedSaadEldin; HAFEZ, B. (7 Ed.). **Reproduction in farm animals**. John Wiley & Sons, 2013.

HALL, Peter F.; EIK-NES, Kristen B. The influence of gonadotropins in vivo upon the biosynthesis of androgens by homogenate of rat testis. **Biochimicaetbiophysicaacta**, v. 71, p. 438-447, 1963.

HALLIWELL, Barry; GUTTERIDGE, John MC. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford University Press, USA, 2015.

HAMER, Dean H. Metallothionein. **Annual review of biochemistry**, v. 55, n. 1, p. 913-951, 1986.

HATAYAMA, Ichiro; SATOH, Kimihiko; SATO, Kiyomi. Developmental and hormonal regulation of the major form of hepatic glutathione S-transferase in male mice. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 140, n. 2, p. 581-588, 1986.

HEATH, J. C. et al. Cadmium as a carcinogen. **Nature**, v. 193, n. 4815, p. 592, 1962.

HESSEL, G. Untersuchungenüber das Schicksal des Cadmiums nachparenteraler Einverleibung. **Biochem. Ztschr**, v. 177, p. 146-155, 1926.

HIDIROGLOU, M.; KNIPFEL, J. E. Zinc in Mammalian Sperm: A Review1. **Journal of dairy science**, v. 67, n. 6, p. 1147-1156, 1984.

HORST, ERICH KÖNIG; HANS, GEORG LIEBICH. Anatomia dos animais domésticos. **Editora Artmed**, 4ª edição, 2011.

IBRAHIM, Ahmed et al. Evaluation of chemical castration with calcium chloride versus surgical castration in donkeys: testosterone as an endpoint marker. **BMC veterinary research**, v. 12, n. 1, p. 46, 2016.

IJAZ, A. et al. Effect of intra testicular injection of formalin on seminiferous tubules in Awassi lambs. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 20, n. 3, p. 129-134, 2000.

IMMEGART, Heidi M.; THRELFALL, Walter R. Evaluation of intratesticular injection of glycerol for nonsurgical sterilization of dogs. **American journal of veterinary research**, v. 61, n. 5, p. 544-549, 2000.

JANA, K.; SAMANTA, P. K.; GHOSH, D. Dose-dependent response to an intratesticular injection of calcium chloride for induction of chemosterilization in adult albino rats. **Veterinary research communications**, v. 26, n. 8, p. 651-673, 2002.

JANA, Kuladip; SAMANTA, P. K.; GHOSH, D. Evaluation of single intratesticular injection of calcium chloride for nonsurgical sterilization of male Black Bengal goats (*Capra hircus*): a dose-dependent study. **Animal reproduction science**, v. 86, n. 1-2, p. 89-108, 2005.

JANA, Kuladip; SAMANTA, Prabhat K. Clinical evaluation of non-surgical sterilization of male cats with single intra-testicular injection of calcium chloride. **BMC veterinary research**, v. 7, n. 1, p. 39, 2011.

JANA, Kuladip; SAMANTA, Prabhat Kumar. Evaluation of single intratesticular injection of calcium chloride for nonsurgical sterilization in adult albino rats. **Contraception**, v. 73, n. 3, p. 289-300, 2006.

JANA, Kuladip; SAMANTA, Prabhat Kumar. Sterilization of male stray dogs with a single intratesticular injection of calcium chloride: a dose-dependent study. **Contraception**, v. 75, n. 5, p. 390-400, 2007.

JANETT, F. et al. Vaccination against gonadotropin-releasing factor (GnRF) with Bopriva significantly decreases testicular development, serum testosterone levels and physical activity in pubertal bulls. **Theriogenology**, v. 78, n. 1, p. 182-188, 2012.

JENKINS, W. L.; CLARK, D. R. A review of drugs affecting the heart. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 171, n. 1, p. 85, 1977.

JOHNSON, A. L.; HOWARDS, STUART S. Intratubular hydrostatic pressure in testis and epididymis before and after vasectomy. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, v. 228, n. 2, p. 556-564, 1975.

JOHNSTON, Shirley D.; ROOT KUSTRITZ, Margaret V.; OLSON, Patricia S. **Canine and feline theriogenology**. 2001.

JUNAIDI, A. et al. Use of a new drug delivery formulation of the gonadotrophin-releasing hormone analogue Deslorelin for reversible long-term contraception in male dogs. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 15, n. 6, p. 317-322, 2003.

JUNG, MiJeong et al. Induction of castration by immunization of male dogs with recombinant gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-canine distemper virus (CDV) T helper cell epitope p35. **Journal of veterinary science**, v. 6, n. 1, p. 21-24, 2005.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, José. **Histologia básica**, v. 9, 1999.

KAKKAR, Poonam; MEHROTRA, Sudhir; VISWANATHAN, P. N. Interrelation of active oxygen species, membrane damage and altered calcium functions. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 111, n. 1-2, p. 11-15, 1992.

KAMBOJ, V. P.; KAR, AMIYA B. Antitesticular effect of metallic and rare earth salts. **Journal of reproduction and fertility**, v. 7, n. 1, p. 21-NP, 1964.

KAR, Amiya B.; DAS, R. P. Sterilization of males by intratesticular administration of cadmium chloride. **Acta endocrinologica**, v. 40, n. 3, p. 321-331, 1962.

KAR, AMIYA B.; KAMBOJ, V. P.; GOSWAMI, AJIT. Sterilization of male rhesus monkeys by iron salts. **Journal of reproduction and fertility**, v. 9, n. 1, p. 115-117, 1965.

KIRKPATRICK, Jay F. Seasonal testosterone levels, testosterone clearance, and testicular weights in male domestic cats. **Canadian journal of zoology**, v. 63, n. 6, p. 1285-1287, 1985.

KNIPLING, Edward F. Sterile-Male Method of Population Control: Successful with some insects, the method may also be effective when applied to other noxious animals. **Science**, v. 130, n. 3380, p. 902-904, 1959.

KOGER, L. M. Calcium chloride, practical necrotizing agent. **Bovine Pract**, v. 12, p. 118-119, 1977.

KOGER, L. M. Calcium chloride castration. **Mod Vet Pract**, v. 59, n. 2, p. 119-21, 1978.

KOLONEL, Laurence N. Association of cadmium with renal cancer. **Cancer**, v. 37, n. 4, p. 1782-1787, 1976.

KUTZLER, Michelle; WOOD, Anna. Non-surgical methods of contraception and sterilization. **Theriogenology**, v. 66, n. 3, p. 514-525, 2006.

LADD, A. et al. Development of an antifertility vaccine for pets based on active immunization against luteinizing hormone-releasing hormone. **Biology of Reproduction**, v. 51, n. 6, p. 1076-1083, 1994.

LEOCI, Raffaella et al. A dose-finding, long-term study on the use of calcium chloride in saline solution as a method of nonsurgical sterilization in dogs: evaluation of the most effective concentration with the lowest risk. **Acta veterinária scandinavica**, v. 56, n. 1, p. 63, 2014a.

LEOCI, Raffaella et al. Alcohol diluent provides the optimal formulation for calcium chloride non-surgical sterilization in dogs. **Acta veterinaria scandinavica**, v. 56, n. 1, p. 62, 2014b.

LEWIS, GeorgeP et al. Contribution of cigarette smoking to cadmium accumulation in man. **The Lancet**, v. 299, n. 7745, p. 291-292, 1972.

LOPES, K. R. F.; SILVA, A. R. Castração química de mamíferos machos: revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 38, p. 49-53, 2014.

LUDWIG, C. et al. Reversible downregulation of endocrine and germinative testicular function (hormonal castration) in the dog with the GnRH-agonist azagly-nafarelin as a removable implant "Gonazon"; a preclinical trial. **Theriogenology**, v. 71, n. 7, p. 1037-1045, 2009.

LUNNEN, J. E. et al. Immunization of dogs with bovine luteinizing hormone. **Biology of reproduction**, v. 10, n. 4, p. 453-460, 1974.

MANN, Thaddeus; LUTWAK-MANN, Cecilia. **Male reproductive function and semen: themes and trends in physiology, biochemistry and investigative andrology**. Springer Science & Business Media, 2012.

MARTELLI, A. et al. Cadmium toxicity in animal cells by interference with essential metals. **Biochimie**, v. 88, n. 11, p. 1807-1814, 2006.

MASSEI, Giovanna; MILLER, Lowell A. Nonsurgical fertility control for managing free-roaming dog populations: a review of products and criteria for field applications. **Theriogenology**, v. 80, n. 8, p. 829-838, 2013.

MITCHISON, N. Avrion. The carrier effect in the secondary response to hapten-protein conjugates. I. Measurement of the effect with transferred cells and objections to the local environment hypothesis. **European journal of immunology**, v. 1, n. 1, p. 10-17, 1971.

MITRA, B.; SAMANTA, P. K. Testicular degeneration of scrub bulls by calcium chloride. **Indian Journal of Veterinary Surgery**, v. 21, n. 1, p. 37-38, 2000.

NAZ, Rajesh K. et al. Recent advances in contraceptive vaccine development: a mini-review. **Human Reproduction**, v. 20, n. 12, p. 3271-3283, 2005.

NAZ, Rajesh K.; SAVER, Ashley E. Immunocontraception for animals: current status and future perspective. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 75, n. 4, p. 426-439, 2016.

OHKAWA, Hiroshi; OHISHI, Nobuko; YAGI, Kunio. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351-358, 1979.

OLIVEIRA, E. C. S. et al. Castração química de caninos e felinos por meio de injeção intratesticular de gluconato de zinco-Quebrando paradigmas. **Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte**, v. 35, n. 2, p. 262-265, 2011.

OLIVEIRA, E. C. S. et al. Intratesticular injection of a zinc-based solution for contraception of domestic cats: a randomized clinical trial of efficacy and safety. **The Veterinary Journal**, v. 197, n. 2, p. 307-310, 2013.

OLIVEIRA, Erika CS et al. Intratesticular injection of a zinc-based solution as a contraceptive for dogs. **Theriogenology**, v. 68, n. 2, p. 137-145, 2007.

PARANZINI, Cristiane Sella et al. Effects of chemical castration using 20% CaCl<sub>2</sub> with 0.5% DMSO in tomcats: Evaluation of inflammatory reaction by infrared

thermography and effectiveness of treatment. **Theriogenology**, v. 106, p. 253-258, 2018.

PAŘIZEK, J. The destructive effect of cadmium ion on testicular tissue and its prevention by zinc. **Journal of Endocrinology**, v. 15, n. 1, p. 56-63, 1957.

PAŘIZEK, J. THE THIRD OLIVER BIRD LECTURE STERILIZATION OF THE MALE BY CADMIUM SALTS. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 1, n. 3, p. 294-309, 1960.

PAŘÍZEK, J.; ZÁHOŘ, Z. Effect of cadmium salts on testicular tissue. **Nature**, v. 177, n. 4518, p. 1036, 1956.

PINEDA, Mauricio H. et al. Atrophy of rabbit testes associated with production of antiserum to bovine luteinizing hormone. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 125, n. 3, p. 665-668, 1967.

PIRARD, M. et al. Immunocastration of Farm Animals. In: **Biotechnology in Animal Husbandry**. Springer, Dordrecht, 2001. p. 169-178.

PLANT, T. M. Effects of orchidectomy and testosterone replacement treatment on pulsatile luteinizing hormone secretion in the adult rhesus monkey (*Macaca mulatta*). **Endocrinology**, v. 110, n. 6, p. 1905-1913, 1982.

PURSWELL, B. J.; JOCHLE, W. Targets and historical approaches to non-surgical sterilization in dogs and cats. In: **The Fourth International Symposium on Non-Surgical Methods for Pet Population Control**. 2010. p. 84-8.

RIBEIRO, SUSANA PUGA. **Efeitos do cádmio, chumbo e zinco em epidídimo de ratos Wistar**. 2013. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa.

ROBAIRE, Bernard; HINTON, Barry T.; ORGEBIN-CRIST, Marie-Claire. The epididymis. In: **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Third Edition)**. 2006. p. 1071-1148.

SAMANTA, L.; ROY, A.; CHAINY, G. B. N. Changes in rat testicular antioxidant defence profile as a function of age and its impairment by hexachlorocyclohexane during critical stages of maturation. **Andrologia**, v. 31, n. 2, p. 83-90, 1999.

SCHOEMAKER, N. J. et al. Use of a gonadotropin releasing hormone agonist implant as an alternative for surgical castration in male ferrets (*Mustelaputoriusfuro*). **Theriogenology**, v. 70, n. 2, p. 161-167, 2008.

SCHWARTZE, Erich W.; ALSBERG, Carl L. Studies on the pharmacology of cadmium and zinc with particular reference to emesis. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 21, n. 1, p. 1-22, 1923.

SEELEY, Rod et al. Seeley's anatomy & physiology. **McGrawHill: NY**, v. 31, p. 38, 2011.

SHAFIK, Ahmed. Prolactin injection, a new contraceptive method: experimental study. **Contraception**, v. 50, n. 2, p. 191-199, 1994.

SIKKA, Suresh C. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. **Current medicinal chemistry**, v. 8, n. 7, p. 851-862, 2001.

SILVA, Renata CA et al. Calcium chloride combined with dimethyl sulfoxide for the chemical sterilization of dogs. **Reproduction in Domestic Animals**, 2018.

SOTO, F. R. M. et al. Evaluation of efficacy and safety of zinc gluconate associated with dimethyl sulfoxide for sexually mature canine males chemical neutering. **Reproduction in domestic animals**, v. 44, n. 6, p. 927-931, 2009.

SOTO, Francisco Rafael Martins et al. Adoption of shelter dogs in a Brazilian community: assessing the caretaker profile. **Journal of applied animal welfare science**, v. 8, n. 2, p. 105-116, 2005.

TALWAR, G. P.; NAZ, R. K. Immunological control of male fertility. **Archives of andrology**, v. 7, n. 2, p. 177-185, 1981.

TAYLOR, Gary. **Castration: An abbreviated history of western manhood**. Routledge, 2002.

TSUTSUI, T. et al. Plasma hormone levels and semen quality in male cats during non-breeding and breeding seasons. **Reproduction in domestic animals**, v. 44, p. 291-293, 2009.



VANDERSTICHEL, R. et al. Changes in blood testosterone concentrations after surgical and chemical sterilization of male free-roaming dogs in southern Chile. **Theriogenology**, v. 83, n. 6, p. 1021-1027, 2015.

VANNUCCHI, C. I. et al. Effects of intratesticular administration of zinc gluconate and dimethyl sulfoxide on clinical, endocrinological, and reproductive parameters in dogs. **Theriogenology**, v. 84, n. 7, p. 1103-1110, 2015.

VICKERY, BRIAN H. et al. Dose-response studies on male reproductive parameters in dogs with nafarelin acetate, a potent LHRH agonist. **Journal of andrology**, v. 6, n. 1, p. 53-60, 1985.

WAALKES, Michael P. et al. Cadmium carcinogenesis in male Wistar [CrI:(WI) BR] rats: dose-response analysis of tumor induction in the prostate and testes and at the injection site. **Cancer research**, v. 48, n. 16, p. 4656-4663, 1988.

WANG, M. Neutersol: intratesticular injection induces sterility in dogs. In: **International Symposium on non-surgical methods for pet population control**. 2002. p. 62-65.

WIEBE, John P.; BARR, Kevin J.; BUCKINGHAM, Kevin D. Sustained azoospermia in squirrel monkey, *Saimirisciureus*, resulting from a single intratesticular glycerol injection. **Contraception**, v. 39, n. 4, p. 447-457, 1989.

WILSON, ROBERT H. et al. Effects of continued cadmium feeding. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 71, p. 222-235, 1941.

WU, Xianfu et al. Development of combined vaccines for rabies and immunocontraception. **Vaccine**, v. 27, n. 51, p. 7202-7209, 2009.

YANG, Jian-Ming et al. Cadmium-induced damage to primary cultures of rat Leydig cells. **Reproductive toxicology**, v. 17, n. 5, p. 553-560, 2003.

## **Parte II (Relatório de estágio Final)**

### **1. Introdução**

O estágio Supervisionado Obrigatório do curso de Medicina Veterinária da Universidade de Brasília (UnB) é parte crucial da formação de um médico veterinário competente em sua área de atuação desejada. O estagiário é introduzido às normas e rotina da sua área escolhida, acompanhando o trabalho desenvolvido e, quando possível, auxiliando nesse trabalho, buscando um aprendizado teórico e prático.

Esse relatório visa descrever a rotina do estagiário no departamento de ciências fisiológicas do Instituto de Ciências Biológicas (IB), na área de reprodução animal e relatar suas atividades realizadas durante esse período. Sua duração foi do dia 13 de Agosto de 2018 até o dia 30 de Novembro de 2018, realizado sob supervisão da professora Carolina Madeira Lucci e sua equipe.

Durante a permanência do estagiário, haviam dois estudos sendo realizados pelos orientandos da professora Carolina Lucci: Um estudo em machos, em que se testava o uso de nanopartículas injetadas nos testículos de ratos como método alternativo para promoção de infertilidade, e um estudo em fêmeas, em que se criopreservavam os ovários de gatas, com subsequente autotransplante de fragmentos desses ovários, com objetivo de avaliar métodos que auxiliem na sobrevivência do tecido transplantado e promover desenvolvimento dos folículos pré-antrais.

### **2. Estrutura física**

O Laboratório de Reprodução animal e Endocrinologia está integrado no departamento de ciências fisiológicas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

Possui equipamentos para realizar análises histológicas, confecção de lâminas histológicas e criopreservação de materiais. O prédio ainda dispõe de um centro cirúrgico, onde são realizadas as castrações dos animais

experimentados. Além disso, o departamento dispõe de parceria com outros departamentos, sendo utilizados seus laboratórios para análises mais específicas, como microscopia eletrônica ou análise bioquímica e hemograma dos animais experimentados.

### **3. Atividades Realizadas**

Devido ao grande fluxo de pessoas de diferentes áreas circulante no laboratório, a equipe seguia um cronograma restrito, em que o uso dos equipamentos necessitava aviso prévio. De acordo com a necessidade individual de cada pesquisador, o cronograma semanal era montado para que cada um tivesse mais tempo em um determinado equipamento, de modo em que a capacidade total do laboratório era utilizada sem haver desorganização ou conflito entre os membros da equipe.

#### **Reuniões Semanais**

Às segundas-feiras pela manhã, Os orientandos se reuniam com a professora Carolina Lucci para uma reunião, onde eram discutidos os resultados alcançados durante a semana, assim como a fase em que se encontrava cada experimento. A cada semana, um integrante deveria apresentar um seminário mostrando seu trabalho durante a reunião. Enquanto os mestrandos e doutorandos apresentavam suas pesquisas, aos estagiários era escolhido um artigo científico a ser apresentado, com o intuito de torná-los familiarizados com a leitura e compreensão de artigos.

O seminário do estagiário consistiu na apresentação de dois artigos recentes a respeito da castração química com Cloreto de Cálcio usando-se como veículo o DMSO: Silva et al (2018) e Paranzini et al (2018).

## **Ultrassonografia**

Semanalmente, o estagiário acompanhava o ultrassom dos testículos de ratos do experimento em machos. O ultrassom era utilizado para medir o tamanho dos testículos semanalmente, assim como visualizar a resposta inflamatória causada pelo tratamento.

## **Confecção lâminas histológicas**

Durante o período de estágio, o estagiário auxiliou na confecção de lâminas histológicas em ambos os estudos. Nas fêmeas, os fragmentos ovarianos transplantados eram processados, enquanto nos machos, houve processamento de testículos. Acima disso, o baço, rins e fígado dos machos também foram processados para analisar a possibilidade de transporte das nanopartículas para esses órgãos.

Os testículos são fixados em solução de Bouin até que possam ser processados, enquanto os ovários, devido à natureza do experimento, não podem usar o Bouin, que interferiria nos resultados da imunohistoquímica. Em vez disso, eles são fixados em paraformaldeído a 4% por 48h. Os materiais devem ser postos em cassetes e identificados antes de passar para a próxima fase do processamento. Para que sejam postos em blocos, as amostras precisam passar por um processo de desidratação. Elas são submersas em concentrações crescentes de álcool iniciando em 70% até que se alcance 100%, ficando submersas durante uma hora em cada estágio. Após a desidratação, as amostras são submersas em xilol, sendo esse trocado a cada hora por 3 horas consecutivas, até que o álcool seja substituído por xilol. As peças então, são submersas em paraplast líquido dentro de uma estufa que deve ficar pelo menos 1h em 3 banhos consecutivos para que esse possa penetrar no tecido. Depois de o paraplast penetrar o tecido, o material é levado a uma forma onde é despejado paraplast a 70 °C sobre ele e, ao esfriar, formará um bloco pronto para ser cortado.

Os blocos são cortados em um micrótomo com cortes de 5µm. No caso das fêmeas, os cortes precisam ser seqüenciados de 5 em 5, sendo cada

primeiro corte dessa seqüência corado com hematoxilina e eosina e utilizado para avaliação sob microscopia de luz, enquanto os 4 remanescentes são guardados para fazer colorações especiais posteriormente. Essas seqüências precisam ser realizadas até que se obtenha 250 cortes no total.

Para a coloração, as amostras, já nas lâminas, devem ser colocadas na estufa por pelo menos 2h. Esse processo auxilia a amostra a se fixar melhor nas lâminas. A coloração é feita em bancada separada, junto a uma capela de exaustão, devido ao forte odor do xilol. As lâminas são postas em carrinhos e seguem um protocolo de remoção do paraplast com xilol, reidratação da amostra com álcool em concentrações decrescentes e água corrente, coloração com hematoxilina e eosina (Os tempos de exposição variam de acordo com o órgão corado), desidratação com álcool, remoção do álcool com xilol, mantendo a amostra íntegra até que seja terminada a lâmina. Após o término da coloração, monta-se a lâmina, fixando-a à lamínula utilizando Entellan® e pressionando levemente para remoção das bolhas de ar.

### **Contagem e avaliação de folículos**

Nas fêmeas, os folículos são contados e classificados quanto ao estágio de desenvolvimento (primordial, primário, secundário e terciário) e degenerações encontradas no ovócito (ovócito retraído, descolamento total ou parcial, vacuolização, núcleo picnótico), na granulosa (inchaço, picnose) e no próprio folículo (descolamento do estroma, degeneração total). Ao comparar os resultados com os controles, é possível determinar se os diferentes tratamentos testados estão surtindo efeito na sobrevivência dos folículos.

### **Avaliação da morfologia espermática**

Após a eutanásia e obtenção dos testículos, faz-se um macerado da cauda do epidídimo dos animais e pode ser feita uma classificação dos espermatozoides quanto a degenerações, sendo divididas em alterações de cabeça, alterações de peça intermediária e alterações de cauda. Pipeta-se uma

gota dessa solução de macerado entre lâmina e lamínula e conta-se 200 espermatozoides, classificando-os entre normais e defeituosos, classificando as alterações quando presentes.

### **Medida de túbulos seminíferos**

Ao sofrer degeneração, diversas alterações ocorrem em túbulos seminíferos. Sua luz se dilata, as células germinativas se descolam das células de Sertoli, estando visíveis na luz do túbulo ou até mesmo desaparecem completamente, há sinais de inflamação peritubular e alteração no tamanho do túbulo em si. Era usado um microscópio invertido EVOS para se obter imagens digitais das lâminas dos testículos e o programa ImageJ para medição dos túbulos seminíferos. Os túbulos seminíferos mensurados sempre na mesma ordem, a área do túbulo, área da luz do túbulo, diâmetro maior do túbulo, diâmetro menor do túbulo, diâmetro maior da luz do túbulo, diâmetro menor da luz do túbulo, altura maior do epitélio e altura menor do epitélio. A cada testículo, eram medidos 25 túbulos. Em túbulos degenerados, é impossível medir com precisão esses parâmetros, e somente era realizada a medida da área do túbulo.

### **Análise de sangue**

O sangue dos ratos era coletado durante o processo da eutanásia para que fossem realizados hemograma e análises bioquímicas, buscando averiguar o estado de saúde e resposta do organismo às nanopartículas. As análises avaliam função hepática, utilizando-se de testes de ALT e AST, e função renal, verificando marcadores como uréia e creatinina. Essas análises são necessárias, pois é preciso saber se houve danos renais ou hepáticos causados pela presença de nanopartículas.

#### **4. Conclusão**

A rotina no Laboratório de Reprodução animal é intensa e cada pesquisa é composta por diversas fases, cada uma levando meses para ser concluída. Durante a permanência do estagiário, apenas uma parcela das análises necessárias ainda não havia sido concluída, sendo acompanhados apenas os procedimentos finais para obtenção dos resultados dos experimentos.

A elaboração de um experimento científico requer a colaboração de diversos membros de áreas distintas para seu sucesso. Para operar os equipamentos mais complexos, era necessário o auxílio de técnicos capacitados e, sem o auxílio de um médico veterinário, seria impossível realizar a ovariopexia nas gatas e o ultrassom nos testículos dos ratos. Além disso, os biotecnólogos são dotados de conhecimentos extensos na área laboratorial, sendo mais familiarizados com os procedimentos e protocolos das diversas áreas da biotecnologia, capazes de atuar em diversos setores.

O estágio final no Laboratório de Reprodução e Endocrinologia proporcionou ao estagiário, experiência na área laboratorial, assim como conhecimento sobre alguns processos não explorados detalhadamente durante sua graduação. Também foi possível ver a característica multidisciplinar da pesquisa científica, sendo crucial o trabalho em equipe e profissionais de diversas formações.